基于转录组分析筛选凡纳滨对虾低温胁迫下的差异表达基因

董丽君^{1,2,3},孟宪红^{2,3},孔杰^{2,3},罗坤^{2,3},栾生^{2,3},史晓丽^{2,3}

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

2. 青岛海洋科学与技术国家实验室,海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室,山东 青岛 266071;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所,农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室,山东 青岛 266071

摘要:凡纳滨对虾(Litopenaeus vannamei)是中国主要的对虾养殖品种之一,对低温的耐受性较差,低于 18℃就会 停止摄食。为了探究凡纳滨对虾耐低温性状相关基因,选用凡纳滨对虾低温胁迫组(18℃)和常温组(24℃)肝胰腺组 织为实验材料,进行 Illumina HiSeq 2500 测序,对测序原始数据进行拼接、注释,以及筛选分析低温胁迫下的差异 表达基因。结果显示,测序共获得 50921 条基因(unigene),平均长度为 828 bp,N50 为 1589 bp,其中 28.13%为已知 基因。基因差异表达分析共筛选得到 243 个低温胁迫相关基因,其中 89 个上调表达,154 个下调表达。功能富集分 析发现,差异表达基因多富集在生物结合和催化过程、过氧化物酶、溶酶体、精氨酸和脯氨酸的代谢以及氨基酸 的生物合成途径中。进一步根据 Q-值共筛选出 10 个差异表达最显著的基因,其中 ATP 结合盒 B 亚家族 6 转运蛋 白基因(ATP-binding cassette sub-family B member 6, ABCB6)、C 型凝集素基因(C type lectin)、谷氨酰胺合成酶基因 (glutamine synthetase, GS)在低温胁迫下均呈下调表达,推测可能参与了凡纳滨对虾低温应答反应。利用 Real time RT-PCR 验证转录组数据,结果证明基于转录组测序筛选低温胁迫下的差异表达基因是可行的。本研究为揭示凡纳 滨对虾耐低温分子调控机制提供了基础数据和理论依据。

关键词:凡纳滨对虾;转录组;低温胁迫;差异表达基因 中图分类号:S917 文献标志码:A 文章编号:1005-8737-(2019)01-0161-11

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),俗称南 美白对虾,原产于太平洋西岸水域秘鲁北部至墨 西哥桑诺拉一带,自1998年从美国夏威夷引进到 中国后,其养殖面积和产量逐年攀升,已成为中 国养殖产量最多的对虾品种之一^[1-2]。但凡纳滨对 虾种源依赖国外进口,造成种质资源退化,严重 制约了凡纳滨对虾养殖业的发展。为解决此问题, 中国对凡纳滨对虾进行了自主选育,目前经全国 水产原种和良种审定委员会审定的凡纳滨对虾新 品种有 7 个,包括"中兴1号"^[10]、"中科1号"^[9]、 "科海1号"^[8]、"桂海1号"^[4]、"壬海1号"^[5]、"广 泰1号"^[7]、"海兴农2号"^[6],选育的优良性状包 括生长速度、抗病、耐低温、养殖存活率等,为实现凡纳滨对虾良种本土化打下了良好的基础^[4-10]。

耐低温性状是由微效多基因控制的数量性状^[11], 具有复杂的分子响应机制。近年来随着基因组学 和生物信息学等学科的飞速发展,高通量测序技 术越来越成熟,并被广泛应用于功能基因挖掘、 分子标记筛选及信号转导等研究中,为耐低温分 子机制的研究提供了有效的技术手段。曾地刚等^[12] 利用 454 高通量测序技术分析了凡纳滨对虾的肝 胰腺组织的转录组信息,共获得 20225 条基因 (unigenes),平均长度为 507 bp,最大长度为 8980 bp, 其中 68%为已知基因。杨铭等^[13]通过分析凡纳滨

收稿日期: 2018-02-13; 修订日期: 2018-04-17.

基金项目:国家自然科学基金项目(41676148);中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022017001); 泰山学者良种工程项目和现代农业产业技术体系专项资金(CARS-48).

作者简介: 董丽君(1992-), 女, 硕士研究生, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: 1515872195@qq.com

通信作者: 孟宪红, 研究员, 主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn

对虾的转录组序列, 共挖掘到 14767 条微卫星序 列(simple sequence repeats, SSR), 且 SSR 出现的 频率为 16.76%。Huang 等^[14]利用 RNA-seq 技术, 分析了凡纳滨对虾低温组(13℃)和常温组(28℃) 的转录组序列, 得到 72 个差异表达基因, 并发现 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶信号通路在冷适应中可 能起重要作用。

凡纳滨对虾的适宜生长温度为 25~35℃,对 低温的耐受性较差,低于 18℃时则停止摄食^[3], 低温限制了凡纳滨对虾的养殖季节和地域,影响 对虾养殖的经济效益。本研究利用 Illumina Hiseq 2500 转录组测序技术,比较分析凡纳滨对虾常温 组(24℃)和低温组(18℃)的肝胰腺转录组信息, 筛选低温胁迫下差异表达的基因及与低温相关的 代谢途径。期望研究结果为揭示凡纳滨对虾的耐 低温分子机制提供基础数据,为运用分子辅助育 种技术培育耐低温新品种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾取自中国水产科学研究 院黄海水产研究所农业部海水遗传育种中心(青岛 即墨市鳌山卫镇)2014 年培育的 G3 育种群体。

1.2 低温胁迫实验

实验于 2014 年 10 月,待凡纳滨对虾长至 3 月龄,体重为(11.8500±2.3850) g 后开始。随机取 3 个荧光标记的凡纳滨对虾家系,每个家系 48 尾, 设置低温胁迫组(LT)和对照组(CK),同时每组设 置 3 个平行组(每组每个家系 8 尾),分别放于 6 个 整理箱(81 cm×59 cm×51 cm)中混合充气暂养。低 温胁迫组采用冰块降温的方法,水温从 24℃开始 以每天 2℃的速度降温,直至水温降至 18℃后维 持(18.0±0.5)℃至 48 h时取样;对照组水温维持在 (24.0±0.5)℃,与低温胁迫组同时取样。低温胁迫 组和对照组每个家系各取 3 尾虾(共计 18 尾),活 体解剖取肝胰腺组织立即置于液氮中速冻,然后 放-80℃冰箱保存备用。

1.3 RNA 提取及转录组 Illumina Hiseq 2500 测序

按常规 Trizol 法提取每尾虾的肝胰腺组织 Total RNA。通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop

ND-1000 spectrophotometer (Thermo, 美国)检测 RNA 质量及浓度。Total RNA 的浓度要大于 250 ng/μL, OD₂₆₀/OD₂₈₀介于 1.8~2.2 之间, OD₂₆₀/ OD₂₃₀ 值应大于等于 2.0, 以确保 RNA 无降解, 无 污染。最后将 Total RNA 送交北京诺禾致源生物 信息科技有限公司测序。

1.4 转录组序列组装及注释

测序原始数据经过质量分析,去除带接头、 低质量和 N(表示无法确定碱基信息)比例大于 10%的序列,质控后的序列用 Trinity 软件进行无 参拼接,每个基因以拼接得到的最长序列为该基 因序列(unigene),即参考序列^[15]。将基因序列分 别与 NCBI Nt, NCBI Nr, Pfam (http://pfam.sanger. ac.uk/), KOG/COG (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CO/), Swiss-prot (http://www.ebi.ac.uk/uniprot/), KEGG (http:// www.genome.jp/kegg/), GO (http://www.geneontol ogy. org/) 7 大数据库进行比对注释。

1.5 差异表达分析及差异基因富集分析

本研究采用 FPKM (expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 方法计算基因的表达量^[16]。再利用 DEGseq 软件包筛选差异表达基因,筛选阀值为 Fold change>2和 *Q*-value<0.05,且 *Q*-value 越小基因表达量差异越显著^[17]。最后,分别利用 GOseq R和 KOBAS 软件包进行差异表达基因的 GO和 KEGG 富集分析(false discovery rate, FDR< 0.05)^[18-19]。

1.6 Real time RT-PCR 验证

随机取 10 个差异表达基因,其中包含 5 个上 调和 5 个下调表达的基因。利用 Primer 5.0 软件 设计特异性引物(表 1),送交生工生物工程(上海) 股份有限公司合成。Real time RT-PCR 验证实验 采用 TaKaRa 相对荧光定量试剂盒,以 18S rRNA 为内参基因,每个样品 3 次重复,并利用 2^{-ΔΔC_T}法 分析基因的相对表达量^[20],与测序数据进行比较 分析。

2 结果与分析

2.1 转录组拼接

本研究对 Illumina Hiseq 2500 测序得到的原

始数据进行拼接,结果如表 2 所示。拼接后共得 到 61098 条转录本(Transcripts),其拼接长度范围 在 200~37499 bp,平均长度为 1000 bp,N50 为 2043 bp,长度大于 2000 bp 的有 8569 条,约占全 部 Transcript 的 14%。同时得到 50921 条基因 (unigenes),其拼接长度范围在 200~37499 bp,平 均长度为 828 bp,N50 为 1589 bp,其中长度大于 2000 bp 的有 5130 条,约占总基因(unigene)的 10%。拼接结果说明原始数据拼接质量较高,可用 于后续功能注释和差异表达基因分析。

2.2 转录组序列注释

利用 Nr、Nt、Pfam、KOG/COG、Swiss-prot、 KEGG、GO 七大数据库对凡纳滨对虾转录组数据 进行\基因功能注释,结果见表 3。比对发现 14329 条基因在 Nr 数据库中有注释,占比为 28.13%; 18988 条基因在至少其中一个数据库中获得注释, 占总数的 37.28%; 1573 条基因在上述七大数据库 中均获得注释,占全部基因的 3.08%。

2.3 差异基因表达谱

通过对 3 个家系在低温胁迫(18℃)和常温(28℃) 条件下的差异表达基因分析结果绘制火山图(图 1)。结果显示,在低温胁迫条件下,家系 1 有 641 个基因上调表达,有 1036 个基因下调表达;家系 2 有 630 个基因上调表达,1343 个基因下调表达; 家系 3 有 212 个基因上调表达,475 个基因下调表达。

为了排除不同遗传背景对实验结果的影响, 本研究将 3 个家系在低温胁迫下的差异表达基因 再次进行比较,绘制维恩图,寻找在低温胁迫下 共有的差异表达基因。如图 2 所示,在低温胁迫 条件下,3 个家系间有 243 个共同的差异表达基因, 其中 89 个基因上调表达, 154 个基因下调表达。这 243 个共同的差异表达基因极有可能与凡纳滨对 虾响应耐低温胁迫的分子机制有关。

本研究为了进一步筛选得到与凡纳滨对虾耐 低温性状相关的基因,又依据 Q-value 越小,差异 表达越显著的原则,从 3 个家系在低温胁迫下共 同差异表达的 243 个基因中,筛选到差异表达最 显著的前 10 个基因,如表 4 所示。

表 1 用于转录组数据验证的引物 Tab. 1 Genes and specific primers used for validation of RNA-seq data by real time PCR

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence (5'-3')
c11627_g1F	CGGCATCCCACCTGAATTAT
c11627_g1R	ATATGGCAGCCAGGACAACAT
c26036_g1F	GAGTCCCCTTTGTCGATGCA
c26036_g1R	GACGTCCACGGTTGCTCAT
c21423_g1F	GCTGCTGGACGTCGAACTC
c21423_g1R	CGTGATTCGGTCTCCGTAGAA
c24044_g1F	TGGGCACGTGATTGTATTTG
c24044_g1R	ACGACCTGAAAATGCCACAT
c27619_g2F	TCAGACAAAGAACCGATCCAAAC
c27619_g2R	GTCTGTCAGCATTTTGGCAAAG
c24517_g1F	CCGGACACAGCACCAGACT
c24517_g1R	CCGTGGGTGCAAGTGAAAG
c6363_g1F	TACGGCTCCGTCATGCACTAC
c6363_g1R	TCCTCCGTGACGATGGTCTT
c26712_g1F	CCCATCACGAGGGCATCA
c26712_g1R	CCCAGATGGTTCGGATTTTG
c28803_g1F	GAGAGCCAGAATAGGGTTGCA
c28803_g1R	TGCCCTCTCGACCTTTGG
c22778_g2F	CACACCGCTCTTGGCAATG
c22778_g2R	GTCCTCGTGCAACATCTTCAGTA
18S F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18S R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

表 2 转录组拼接结果 Tab. 2 Assembly statistic of transcripts and unigenes

	最小值/bp min length	平均值/bp mean length	中间值/bp median length	最大值/bp max length	N50	N90	总数 total
转录本 transcripts	201	1000	451	37499	2043	346	61098
基因 unigenes	201	828	393	37499	1589	296	50921

注: N50 和 N90 分别为将拼接转录本按长度从长至短排序, 累加转录本的长度, 到不小于总长 50%和 90%的拼接转录本的长度. Note: N50 and N90 are the lengths of the spliced transcripts from long to short, and the length of the transcripts is increased to not less than the length of the spliced transcript of 50% and 90% of the total length. 凡纳滨对虾转录组数据在七大数据库中的注释成功率统计表

Tab. 3 The success rate of note records of <i>Litopenaeus vannamei</i> transcriptome data in the seven databases							
	项目 item	基因数目 number of unigenes	比例/% percentage				
	Nr 注释 annotated in Nr	14329	28.13				
	Nt 注释 annotated in Nt	2707	5.31				
	KOG 注释 annotated in KOG	6810	13.37				
	Swiss-prot 注释 annotated in Swiss-Prot	11741	23.05				
	Pfam 注释 annotated in Pfam	14992	29.44				
	GO 注释 annotated in GO	15373	30.18				
	KOG 注释 annotated in KOG	8733	17.15				
	全部数据库均有注释 annotated in all databases	1573	3.08				
	至少一个数据库有注释 annotated in at least one database	18988	37.28				
	unigenes 总数 total unigenes	50921	100				





a. 家系 1 差异基因火山图; b. 家系 2 差异基因火山图; c. 家系 3 差异基因火山图. 图中横线为 Q<0.05 阈值, 并且越靠近左边或右边的点表达差异越显著. 图中红色圆点表示低温胁迫时上调表达基因, 绿色圆点表示低温 胁迫时下调表达基因, 蓝色圆点表示非差异表达基因.

Fig. 1 The 'volcano plot' picture of differentially expressed genes of *Litopenaeus vannamei* under cold challenge a. The volcanic plot of the family 1 differential gene; b. The volcanic plot of the family 2 differential gene; c. The volcanic plot of the family 3 differential gene. The horizontal line in the figure shows the Q<0.05 threshold, and the closer the point to the left or the right is, the more significant the difference is. In the figure, the red dot indicates the up-regulated gene, the green dot indicates the down-regulated gene, and the blue dot indicates the non-differentially expressed gene.

2.4 低温胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 GO 富 集分析

表 3

对低温胁迫下差异表达基因(包括 243 个共同 差异表达基因)做 GO 功能分类统计,结果如图 3 所示。差异基因在生物过程类、细胞成分类和分 子功能类中均有分布,以生物过程类居多。在生 物过程类中,代谢途径、细胞途径以及单有机体 过程是包含差异基因最多的 3 类;在细胞成分类 中,最多的是细胞组分和细胞两类;而在分子功 能类中,则是结合和催化活性这两类包含了最多 的差异基因。

2.5 低温胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 KEGG 富集分析

从 KEGG 富集分析中选取富集最显著的 20 个代谢途径(pathway), 做 KEGG 富集散点图(图 4)。 在此图中, KEGG 富集程度通过 Rich factor、*Q*-value 和富集到此通路上的基因个数来衡量^[19]。*Q*-value 的 取值范围为[0, 1], 越接近于零, 表示富集越显著。 研究结果发现, 差异表达基因主要集中在过氧化物酶 (peroxisome)、溶酶体(lysosome)、精氨酸和脯氨 酸的代谢(arginine and proline metabolism)以及氨基 酸的生物合成(biosynthesis of amino acid)途径中。



图 2 低温胁迫下凡纳滨对虾 3 个家系差异表达基因维恩图 图中不同颜色的圆形分别表示 3 个不同家系,重叠部分数字 表示家系间共同的差异基因数目,未重叠部分数字表示各家 系独有的差异基因数目.

Fig.2 Venn diagram of differentially expressd genes of *Lito*penaeus vannamei under cold stress

Circles of different colors indicate three different families, the overlapping part number indicates the number of differential genes common among families, while the non-overlapping part number indicates the number of differential genes unique to each family.

2.6 转录组数据的 real time RT-PCR 验证

从 3 个凡纳滨对虾家系筛选到的 243 个共差 异表达基因中,随机选取 10 个差异表达基因,其 中 c21423_g1、c11627_g1、c24044_g1、c27619_g2、 c26036_g1 这 5 个基因在低温胁迫下呈上调表达, c6363_g1、c28803_g1、c26712_g1、c22778_g2、 c24517_g1 这 5 个基因呈下调表达。利用 real time RT-PCR 对转录组测序结果进行验证。转录组结果 中上调表达的 5 个基因其验证结果也为上调表达, 转录组结果中下调表达的 5 个基因其验证结果也 为下调表达,表明基于转录组测序数据的基因差 异表达分析结果是可信的(图 5)。

3 讨论

3.1 凡纳滨对虾低温转录组分析

凡纳滨对虾的肝胰腺组织是一个非常重要的 器官,具有解毒、消化吸收和储存营养物质等功 能。已有研究表明温度胁迫可影响凡纳滨对虾肝

	表 4	低温胁迫	下凡纳滨西	İ虾差异 #	表达最显著的	的前 10 个	基因		
Tab. 4	The top 10 d	ifferentially	expressed	genes of	Litopenaeus	vannamei	under co	ld chall	enge

基因 ID gene ID	NR 注释 annotated in NR	log ₂ (差异倍数) log ₂ (fold change)	表达模式 regulation
c27619_g2	藤壶幼虫特异性表达基因 BCS-2	5.62	上调 up
c28389_g2	未知基因 unknown gene	3.97	上调 up
c26629_g1	假定蛋白: DAPPUDRAFT_305386 hypothetical protein: DAPPUDRAFT_305386	-3.36	下调 down
c19076_g1	C 型凝集素 C type lectin	-3.78	下调 down
c4419_g1	假定蛋白:DAPPUDRAFT_207173 hypothetical protein: DAPPUDRAFT_207173	-3.37	下调 down
c26837_g1	未知基因 unknown gene	4.26	上调 up
c23354_g1	ATP 结合盒 B 亚家族 6 转运蛋白 ATP-binding cassette sub-family B member 6, ABCB6	-2.48	下调 down
c28638_g1	谷氨酰胺合成酶 glutamine synthetase, GS	-2.39	下调 down
c27619_g1	未知基因 unknown gene	5.92	上调 up
c28803_g1	丝氨酸羟甲基转移酶 serine hydroxymethyltransferase, SHMT	-3.03	下调 down

胰腺组织的抗氧化酶和消化酶活性,以及生长代谢和能量代谢等^[46-47]。因此本研究以选育凡纳滨 对虾的肝胰腺组织为实验材料,通过高通量测序 技术分析其在低温胁迫和常温条件下转录水平的 差异。为了消除遗传差异对结果的影响,选用了3 个家系分别对其转录组差异进行比较,共获得 50921条基因(unigenes),其中28.13%为已知基因, 并在家系1、2、3中分别筛选到1677、1973、687 个差异表达基因,其中有243个基因在3个家系 中共表达,这在一定程度上丰富了凡纳滨对虾的转录组数据资源库。基因富集结果显示,低温胁迫下差异表达基因多富集在过氧化物酶、溶酶体、精氨酸和脯氨酸的代谢以及氨基酸的生物合成途径中。已有研究表明低温可影响尼罗罗非鱼(Oreochromis niloticus)、锯缘青蟹(Scylla serrata)、点蓝子鱼(Siganus guttatas)、斑马鱼(Barchydanio rerio var)、皱纹盘鲍(Haliotis discus hannai)等水产动物的抗氧化酶活性^[21-25],而溶酶体则在低温诱导的细胞



图 3 低温胁迫下凡纳滨对虾差异表达基因 GO 富集分析柱状图 Fig. 3 GO enrichment results of differentially expressed genes of *Litopenaeus vannamei* under cold challenge

程序性死亡中也发挥重要作用^[26]。在植物中,低 温胁迫会致使脯氨酸大量积累,以增加细胞质浓 度,防止细胞脱水,来抵御低温对机体的危害^[27-28], 这一结论已被普遍证实。此外王以斌等^[29]发现脯 氨酸在南极冰藻耐寒机制中也发挥着重要作用。 由此推测低温胁迫会引起凡纳滨对虾细胞凋亡以 及影响其抗氧化酶系统、精氨酸和脯氨酸代谢及 氨基酸的生物合成。

3.2 凡纳滨对虾耐低温性状相关基因

在鱼类中发现的抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)/抗冻糖蛋白(antifreeze glycoprotein, AFGP) 是发现较早的与耐低温相关的基因^[30],而目前文 献报道的与凡纳滨对虾耐低温性状相关的基因主 要有:热休克蛋白基因 (HSPB1、HSP10、TCP-1-Beta),金属硫蛋白基因(MT),外被蛋白基因 (COPE), DEAD-box RNA 解旋酶基因,腺苷酸转 移酶(ANT2)^[31-36]。其中 ANT2 基因和热休克蛋白 基因在拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、南极美露 鳕(*Dissostichus mawsoni*)、吉富罗非鱼(GIFT *Oreochromis niloticus*)等多种水产动物中也曾被 报道与低温应答有关^[37-39]。本研究从 243 个共差

异表达基因中筛选出 10 个差异表达最显著的基 因,包括藤壶幼虫特异性表达基因(BCS-2)、C-型 凝集素基因(C-type lectin)、ATP结合盒蛋白 B 类 基因(ABCB6)、谷氨酰胺合成酶基因(GS)、丝氨 酸羟甲基转移酶(SHMT)、假定蛋白: DAPPUDRAFT 305386、假定蛋白: DAPPUDRAFT 207173 和 3 个未知基因。其中 ABCB6 基因编码 ABC 转运蛋 白,参与机体内的 ABC 转运机制,已有研究发现 ABC转运蛋白与植物多种非生物胁迫有关^[40],并 与扇贝(Patinopecten vessoensis)响应镉胁迫的分 子机制有关^[41]。C-型凝集素作为一种免疫因子在 先天性免疫防御中发挥着重要作用,并已被证实 温度能影响其在大菱鲆(Psetta maxima)和文蛤 (Meretrix meretrix)体内的表达量^[42-43]。GS 参与调 节甲壳动物的氨氮代谢,已有研究表明,温度可 影响凡纳滨对虾的氨氮代谢^[44],且有文献报道温 度能影响水稻中 GS 的活性^[45]。本研究发现 ABCB6、C-型凝集素以及 GS 在凡纳滨对虾受到 低温胁迫时均表现为下调表达模式,因此推测低 温可影响凡纳滨对虾的 ABC 转运机制、免疫调节





0.1

0.2

rich factor

0.3

精氨酸和脯氨酸代谢 arginine and proline metabolism

花生四烯酸 arachidonic acid metabolism







系统和氨氮代谢,且 ABCB6、C-型凝集素和 GS 可能参与凡纳滨对虾的低温胁迫应答反应。

简而言之,本研究结果可为揭示凡纳滨对虾 的耐低温分子调控机制提供基础数据,但这些差 异表达基因还需要进一步验证是否与凡纳滨对虾 耐低温性状密切相关,才能进行更深入的研究。

参考文献:

- Wang X Q, Ma S, Dong S L. Studies on the biology and cultural ecology of *Litopenaeus vannamei*:a review[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2004(4): 94-100. [王兴强, 马甡, 董双林. 凡纳滨对虾生物学及养 殖生态学研究进展[J]. 海洋湖沼通报, 2004(4): 94-100.]
- [2] Fisheries Bureau of the Ministry of Agriculture. China Fishery Statistical Yearbook 2017[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017. [农业部渔业局. 2017 年中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社, 2017.]
- [3] Ponce-Palafox J, Martinez-Palacios C A, Ross L G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931[J]. Aquaculture, 1997, 157(1-2): 107-115.
- [4] Zhao Y Z. Litopenaeus vannamei "Guihai No. 1"[J]. Ocean and Fishery, 2013(3): 54. [赵永贞. 凡纳滨对虾"桂海 1 号"[J]. 海洋与渔业, 2013(3): 54.]
- [5] Meng X H, Luan S, Luo K, et al. *Litopenaeus vannamei* "Renhai No. 1"[J]. Chinese Fisheries, 2016(3): 49-52. [孟宪 红, 栾生, 罗坤, 等. 凡纳滨对虾"壬海 1 号"[J]. 中国水产, 2016(3): 49-52.]
- [6] Kong J, He J G, Jiang X W, et al. *Litopenaeus vannamei* "Haixingnong No. 2"[J]. Ocean and Fishery, 2017(6): 67-71.
 [孔杰,何建国,江谢武,等. 凡纳滨对虾"海兴农 2 号"[J]. 海洋与渔业, 2017(6): 67-71.]
- [7] Anonymous. *Litopenaeus vannamei* "Guangtai No. 1"[J].
 Ocean and Fishery, 2017(6): 34. [佚名. 凡纳滨对虾"广泰 1 号"[J]. 海洋与渔业, 2017(6): 34.]
- [8] Anonymous. Litopenaeus vannamei "Kehai No. 1"[J]. Ocean and Fishery, 2012(10): 58. [佚名. 凡纳滨对虾"科海 1 号"[J]. 海洋与渔业, 2012(10): 58.]
- [9] Anonymous. *Litopenaeus vannamei* "Zhongke No. 1"[J].
 Ocean and Fishery, 2012(4): 50. [佚名. 凡纳滨对虾"中科 1 号"[J]. 海洋与渔业, 2012(4): 50.]
- [10] Anonymous. *Litopenaeus vannamei* "Zhongxing No. 1"[J].
 Farmers Science and Technology Training, 2013(12): 38. [佚
 名. 凡纳滨对虾"中兴 1 号"[J]. 农民科技培训, 2013(12): 38.]
- [11] Chun S X, Yao L K, Xing Y H, et al. Advances on the study of multi-gene expression system[J]. China Biotechnology,

2011, 31(6): 116-123. [楚素霞, 姚伦广, 邢延豪, 等. 多基因表达系统研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(6): 116-123.]

- [12] Zeng D G, Chen X L, Xie D X, et al. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Litopenaeus vannamei*[J]. Genomics and Applied Biology, 2013, 2(3): 308-313. [曾地刚, 陈 秀荔, 谢达祥, 等. 基于高通量测序的凡纳滨对虾的转录 组分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 2(3): 308-313.]
- [13] Yang M, Yu Y, Zhang X J, et al. Development of microsatellite markers from the transcriptome sequences of Pacific white shrimp (*Litopenaus vannamei*)[J]. Marine Sciences, 2017, 41(2): 96-102. [杨铭, 于洋, 张晓军, 等. 基于转录 组数据的凡纳滨对虾微卫星标记开发[J]. 海洋科学, 2017, 41(2): 96-102.]
- [14] Huang W, Ren C H, Li H M, et al. Transcriptomic analyses on muscle tissues of *Litopenaeus vannamei* provide the first profile insight into the response to low temperature stress[J]. PLoS ONE, 2017, 12(6): e0178604.
- [15] Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nature Biotechnology, 2011, 29(7): 644-652.
- [16] Pertea G. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515.
- [17] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. Genome Biology, 2010, 11: R106.
- [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: R14.
- [19] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36: 480-484.
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [21] Kong X H, Wang G Z, Li S J, et al. Antioxidant effects and ATPase activity changes in hepatopancreas of mud crab *Scylla serrata* under low temperature acclimation[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2005, 12(6): 708-713. [孔祥会, 王桂忠,李少菁,等. 低温驯化下锯缘青蟹肝胰腺的抗氧 化效应及 ATPase 活性变化[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6): 708-713.]
- [22] Song Z M, Liu J Y, Zhuang P, et al. Influence of low-temperature stress on the antioxidant enzymes activities and malondialdehyde contents in liver of juvenile *Siganus guttatas*[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(2): 142-150. [宋志明,

刘鉴毅, 庄平, 等. 低温胁迫对点篮子鱼幼鱼肝脏抗氧化 酶活性及丙二醛含量的影响[J]. 海洋渔业, 2015, 37(2): 142-150.]

- [23] Lynch M, Kuramitsu H. Expression and role of superoxide dismutases (SOD) in pathogenic bacteria 1[J]. Microbes and Infection, 2000, 2(10): 1245-1255.
- [24] Xu Q Q, Han B S, Luo J T, et al. Effects of cold stress on ROS production and expression of MAPK proteins in zebrafish ZF4 cells[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(4): 771-776. [许琼琼, 韩兵社, 罗军涛, 等. 低温 胁迫诱导斑马鱼 ZF4 细胞 ROS 及 MAPK 相关蛋白表达的 影响[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 771-776.]
- [25] Jiang W W, Fang J G, Li J Q, et al. Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Journal of Fishery Sciences of China Sciences, 2017, 24(2): 220-230. [姜娓娓, 方建光, 李 加琦,等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2): 220-230.]
- [26] Rauen U, Tittel A, Kerkweg U, et al. 164. Role of lysosomes in cold-induced apoptosis of hepatocytes[J]. Cryobiology, 2006, 53(3): 436-436.
- [27] Klíma M, Vítámvás P, Zelenková S, et al. Dehydrin and proline content in *Brassica napus* and *B. carinata* under cold stress at two irradiances[J]. Biologia Plantarum, 2011, 56(1): 157-161.
- [28] Javadian N, Karimzadeh G, Mahfoozi S, et al. Cold-induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat[J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2010, 57(4): 540-547.
- [29] Wang Y B, Miao J L, Jiang Y H, et al. Roles of proline and soluble sugar in the cold-adaptation of Antarctic ice microalgae[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(2): 198-202. [王 以斌, 缪锦来, 姜英辉, 等. 脯氨酸和可溶性糖在南极冰 藻低温适应机制中的作用[J]. 生物技术通报, 2016, 32(2): 198-202.]
- [30] Davies P L, Hew C L. Biochemistry of fish antifreeze proteins[J]. FASEB Journal, 1990, 4(8): 2460-2468.
- [31] Peng J X, Yin Q, Cui L, et al. Molecular cloning of *Litopenaeus vannamei TCP-1-Beta* gene and analysis on its relationship with cold tolerance[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(4): 604-609. [彭金霞, 殷勤, 崔亮, 等. 凡纳滨对 虾 *TCP-1-Beta* 基因的克隆及其与耐寒性状的相关性[J]. 水生生物学报, 2011, 35(4): 604-609.]
- [32] Peng J X, Fang Z F, Wei P Y, et al. Sequence and expression analysis of metallothionein from *Litopenaeus Vannamei*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2013, 37(4): 678-683. [彭金霞, 房振峰, 韦嫔媛, 等. 凡纳滨对虾 MT 基因序列及其在卵

巢发育和低温胁迫中的表达分析[J].水生生物学报,2013,37(4):678-683.]

- [33] Peng J X, Lyu L H, Wei P Y, et al. Cloning characterization and expression analysis of a cold-inducible DEAD-box RNA helicase gene in *Litopenaeus vannamei*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(3): 474-480. [彭金霞, 吕丽虹, 韦 嫔媛, 等. 低温诱导型凡纳滨对虾 DEAD-box RNA 解旋 酶基因的克隆与表达分析[J]. 水生生物学报, 2016, 40(3): 474-480.]
- [34] Peng J X, Jiang X Z, Fang Z F, et al. Sequence and expression analysis of *COPE* gene from *Litopenaeus* vannamei[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(1): 371-376. [彭金霞,蒋小珍,房振峰,等. 凡纳滨对 虾 *COPE* 基因序列及低温表达分析[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 371-376.]
- [35] Yin Q, Cui L, Peng J X, et al. Molecular cloning of LVANT2 gene and its expression pattern by cold induction[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2012, 36(1): 24-28. [殷勤, 崔亮, 彭 金霞, 等. 凡纳滨对虾 ANT2 基因的克隆及低温表达谱分 析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(1): 24-28.]
- [36] Peng J X, Wei P Y, Yin Q, et al. Sequence of HSP10 gene in Litopenaeus vannamei and its low temperature expression analysis[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 44(5): 838-843. [彭金霞, 韦嫔媛, 殷勤, 等. 凡纳滨对虾 HSP10 基因序列与低温表达分析[J]. 两南农 业学报, 2013, 44(5): 838-843.]
- [37] Yu K, Ye H H, Huang C C, et al. Effects of different temperature and salinity on the expression of adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) mRNA in the mud crab, Scylla paramamosain[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(6): 1172-1180. [于坤, 叶海辉, 黄陈翠, 等. 拟穴青蟹 ANT2 基因在不同温度和盐度条件下的应激表达[J]. 中国 水产科学, 2014, 21(6): 1172-1180.]
- [38] Liu B, Wang M Y, Xie J, et al. Effects of acute cold stress onserum biochemical and immune parameters and liver *HSP70* gene expression in GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(17): 4866-4873. [刘波, 王美垚, 谢骏, 等. 低温应激对 吉富罗非鱼血清生化指标及肝脏 *HSP70* 基因表达的影响 [J]. 生态学报, 2011, 31(17): 4866-4873.]
- [39] Chen Z Z, Cheng C H C, Zhang J F, et al. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(35): 12944-12949.
- [40] Stéphane G, Hélène J, Alain V, et al. AtMRP6/AtABCC6, an ATP-Binding cassette transporter gene expressed during

early steps of seedling development and up-regulated by cadmium in *Arabidopsis thaliana*[J]. BMC Plant Biology, 2008, 8: 22.

- [41] Fang C W, Huang Q Y, Ling X P, et al. Stress proteins of gill tissue in *Patinopecten yessoensis* exposed to cadmium salt[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2010, 31(3): 507-513. [方财王, 黄清育, 凌雪萍, 等. 在镉盐胁迫下扇 贝鳃组织应激蛋白的研究[J]. 高等学校化学学报, 2010, 31(3): 507-513.]
- [42] Xia D D, Ma A J, Huang Z H, et al. Effect of environmental stress on the function of C-type lectin in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2017, 41(2): 161-169. [夏丹丹, 马爱军, 黄智慧, 等.环境胁迫对大菱 鲜 C-型凝集素功能的影响[J]. 水产学报, 2017, 41(2): 161-169.]
- [43] Li M, Zhou S M, Liu L, et al. Molecular clone and expression of C-type lectin in *Meretrix meretrix*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1186-1192. [李猛,周素明, 刘璐,等. 文蛤(*Meretrix meretrix*) C-型凝集素基因的分子 克隆及表达分析[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1186-1192.]
- [44] Zhang T, Sun C B, Guan R L. Effect of multi-factors on energy metabolism of juvenile *Litopenaeus vannamei*[J].

Journal of Tropical Organisms, 2012, 3(1): 11-15. [张特, 孙 成波, 关仁磊. 多因子对凡纳滨对虾仔虾能量代谢的影响 [J]. 热带生物学报, 2012, 3(1): 11-15.]

- [45] Lu B B, Zhou W, Zhang J, et al. Effect of temperature on expression of glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice plants[J]. Journal of Wuhan University (Science Edition), 2002, 48(2): 239-242. [陆彬彬,周卫,张 吉,等. 温度对水稻谷氨酰胺合成酶和 NADH-谷氨酸合 酶表达的影响[J]. 武汉大学学报(理学版), 2002, 48(2): 239-242.]
- [46] He P P, Wei P Y, Zhao Y Z, et al. Effects of different low temperature stress on activities of digestive enzymes in *Penaeus vannamei*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(1): 233-237. [何苹萍, 韦嫔媛, 赵 永贞, 等. 不同程度低温胁迫对凡纳滨对虾主要消化酶活 性的影响[J]. 西南农业学报, 2017, 30(1): 233-237.]
- [47] Zhu M K, Yao C L. The impact of temperature stress on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(5): 669-678. [朱孟凯,姚翠鸾. 温度胁迫对凡纳滨对虾肝胰腺氧代谢及能量代谢的影响 [J]. 水产学报, 2015, 39(5): 669-678.]

Screening of differentially expressed genes related to the cold tolerance in *Litopenaeus vannamei* based on high-throughput transcriptome sequencing

DONG Lijun^{1, 2, 3}, MENG Xianhong^{2, 3}, KONG Jie^{2, 3}, LUO Kun^{2, 3}, LUAN Sheng^{2, 3}, SHI Xiaoli^{2, 3}

- 1. Fisheries and Life Sciences College, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306;
- Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, Shandong, China;
- The Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, Shandong, China

Abstract: Litopenaeus vannamei is native to the northern waters from the Pacific West Coast to Sonora, Mexico. Since its introduction to China from Hawaii in 1998, its area and product have increased every year and have become one of the most widely produced shrimp species in China. It is suitable for growth at temperatures of $25-35^{\circ}$ C; below 18° C, it stops feeding. Low temperature limits the farming season and area of *L. vannamei*, thus affecting the economic benefits. In order to explore the genes related to the low temperature tolerance of *L. vannamei*, hepatopancreases were chosen from the low temperature stress group (18° C) and the normal temperature group (24° C) of three families to conduct Illumina HiSeq 2500 sequencing. The analysis of the sequencing data via splicing,

annotation, and differential expression revealed that a total of 214.6 million clean reads were obtained and assembled into 50921 final unigenes with an average length of 828 bp (N50=1534 bp). The assembled unigenes contained 14329 significant unigenes (28.13% of all unigenes) after BLASTX against the Nr database (E-value cut-off of 10⁻⁵). Seven databases, Nr, Nt, GO, KEGG, Swiss-prot, KOG, and Pfam, were used to annotate 1573 unigenes, accounting for 3.08% of all unigenes. The results comparing the digital gene expression data between the challenged and control shrimp showed that under low temperature stress, the expression of 641 genes was up-regulated and 1036 genes were down-regulated in family 1; 630 genes were up-regulated and 1343 genes were down-regulated in family 2; and 212 genes were up-regulated and 475 genes were down-regulated in family 3. Furthermore, 243 genes were differentially expressed in all three families, including 89 and 154 genes whose expressions were up- and down-regulated, respectively, under low temperature stress. The functional enrichment analysis revealed that the differentially expressed genes were more abundant during binding, catalytic activity, the biosynthesis of amino acids, and peroxisome, lysosome, arginine, and proline metabolism. According to the Q-value, three of the top 10 genes included the ATP-binding cassette subfamily B member 6 (ABCB6), C-type lectin, and glutamine synthetase (GS). The ABCB6 gene encodes the ABC transporter and participates in the ABC transport mechanism. It has been found that the ABC transporter is involved in many abiotic stresses in plants. C-type lectin, as an immunological factor, plays an important role in the innate immune defense, and it has been demonstrated that temperature can affect its expression in both Psetta maxima and Meretrix meretrix. Glutamine synthase (GS) is involved in the regulation of ammonia nitrogen metabolism in crustaceans. Studies have shown that temperature can affect the metabolism of ammonia nitrogen in L. vannamei. C-type lectin and GS are both down-regulated under low temperature stress, so they may participate in the low temperature response mechanisms of L. vannamei, but further verification is needed. In this study, we selected 10 genes from 243 differentially expressed genes; five of the genes were up-regulated and five were down-regulated. Real time RT-PCR was used to verify the transcriptome sequencing results. The results showed that RNA-seq and real time RT-PCR produced similar expression patterns for the 10 different genes, which indicates that the differential gene expression results based on the transcriptome sequencing were credible. This study laid the foundation for the discovery of low temperature-related genes and molecular markers. It also provides a theoretical basis for in-depth discussion on the molecular determinant mechanism of low temperature resistance in L. vannamei and may guide the molecular breeding of L. vannamei in future studies.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; transcriptome; low temperature stress; differentially expressed genes Corresponding author: MENG Xianhong. E-mail: mengxianhong@ysfri.ac.cn