

不同病原菌胁迫下青蛤血淋巴转录组中免疫相关基因的比较

赵婷¹, 潘宝平^{2*} (1. 天津医学高等专科学校, 天津 300222; 2. 天津师范大学生命科学学院, 天津市动植物抗性重点实验室, 天津 300387)

摘要 利用病原微生物革兰氏阳性藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) 和革兰氏阴性鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 分别感染活体青蛤, 采用第二代测序 MiSeq 技术测序, 构建了青蛤血淋巴中应答 2 种病原物的转录组文库。根据 KEGG 等数据库注释信息对 Unigene 进行生物学通路注释, 预测出青蛤免疫信号通路的差异性表达基因及相关注释信息。结果发现, 共注释并筛选出 2 605 个差异表达基因, 其中 893 个基因注释到 15 个免疫相关的通路中。该研究可为探索青蛤的免疫识别方式和信号传导路径提供依据。

关键词 青蛤; 转录组文库; 鳃弧菌; 藤黄微球菌; 免疫相关基因
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)27-0084-04

Comparison of Immune-related Genes in Transcriptome Library of *Cyclina sinensis* Hemolymph under the Stress of Different Pathogenic Bacteria

ZHAO Ting¹, PAN Bao-ping² (1. Tianjin Medical College, Tianjin 300222; 2. Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387)

Abstract *Cyclina sinensis* were injected with *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum* respectively. Using the Illumina Miseq system of second-generation sequencing technology, two transcriptome library of hemolymph was constructed. Unigene could be annotated to biological pathway by KEGG database to predict differential expression network of immune signaling pathway in *C. sinensis*. The results showed that 2 605 differentially expressed genes were found and a total of 893 genes annotated to 15 immune related pathways. This research could provide basis for exploring immune recognition and signal transduction pathway in *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*; Transcriptome library; *Vibrio anguillarum*; *Micrococcus luteus*; Immune-related genes

青蛤养殖是我国传统的海滨经济产业, 蕴含着巨大的发展前景^[1]。近年来, 由于青蛤养殖产业中出现的高密度投放、种质退化及养殖环境污染等问题, 屡次发生病害及大面积死亡现象, 给青蛤养殖业造成了巨大的经济损失^[2-4], 有关贝类病害问题已成为制约贝类养殖业持续发展的重要因素之一。青蛤的病害防治应从外因和内因 2 个方面入手, 外因方面要求改善贝类的养殖环境, 内因方面则要求提高贝类自身的抗病能力, 即通过分子免疫学技术寻找物种的免疫相关基因和探索免疫应答机制, 最终揭示贝类的免疫调控分子机制并为抗病品系选育提供有价值的数据库。

目前, 有关贝类转录组的研究已成为贝类免疫学研究的热点, 亦成为研究者获得大量免疫抗病基因的有效途径之一。Hou 等^[5]通过 454 高通量测序方法对虾夷扇贝成体各组织和各发育阶段的转录组进行分析, 一些与免疫、抗逆性、生长和繁殖相关的基因被发现, 为虾夷扇贝的基因组研究和遗传提供重要的平台。Huan 等^[6]将文蛤不同发育阶段的幼虫进行转录组测序, 分析了文蛤 4 个幼虫发育阶段的表达差异, 通过对序列拼接及基因功能注释, 发现与生长、发育及免疫相关的基因。结合文献检索结果和 GenBank 中注册青蛤 EST 的情况可知, 国内外对青蛤免疫功能基因的研究刚刚起步^[7], 因此构建青蛤转录组文库大规模进行测序是十分必要的。笔者采用第二代测序技术对在不同病原物刺激下的青蛤血淋巴转录组进行了比较, 以期揭示青蛤的免疫应答与免疫调控机制提供有价值的数据库, 同时也为青蛤养殖实践中

的病害防治策略提供新的研究途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料 从天津大港海滩沿岸采集的青蛤作为试验材料, 随机选取没有损伤、形态大小一致的青蛤样品, 暂养于通氧气的海水中, 海水密度约 1.030 g/cm³, 温度保持在 22 ℃ 左右, 海水 pH 7.0, 投喂 5‰ 的小球藻, 7 d 后做建库试验准备。

1.2 试验方法

1.2.1 侵染试验。鳃弧菌在 28 ℃ 条件下用 2216E 大量培养菌株, 藤黄微球菌在 37 ℃ 条件下用 LB 大量培养菌株, 分别进行菌液制备。24 h 后菌液浑浊, 经转速 3 000 r/min 离心 10 min, 将 2 种菌体分别用过滤灭菌的海水清洗 3 次, 去除多余残留培养基, 用同样海水重新悬浮菌体, OD₆₀₀ 控制在 0.4。随机抽样 12 只健康青蛤, 备用制备转录组测序样品。然后, 采用随机分组的方式分成鳃弧菌刺激组和藤黄微球菌刺激组。在闭壳肌内分别注射等量的菌悬液, 分别在注射后 6 和 12 h 后取青蛤血淋巴。血淋巴在 4 ℃ 条件下, 8 000 r/min 离心 10 min 收集血细胞, 加入 1 mL Trizol, 置于 -80 ℃ 超低温冰箱中备用。

1.2.2 青蛤转录组文库的构建。采用 Trizol 法提取青蛤血淋巴总 RNA, 产物使用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Kits 进行分离与纯化。纯化后加入裂解缓冲液将 mRNA 打断成短的片段, 采用随机引物逆转录合成 cDNA。纯化的双链 cDNA 再经末端修复、加 A 尾、加测序接头、连接产物纯化、PCR 富集接头连接 DNA 等步骤完成整个文库的制备。利用 Life Tech (Invitrogen) Qubit® 2.0 荧光计及生化分析仪 (Agilent 2100 高灵敏度芯片) 检测文库质量, 检测流程参照其说明书。经质量检测合格的文库使用 Illumina MiSeq 测序仪上

基金项目 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目 (12JCZDJC22800)。
作者简介 赵婷 (1988—), 女, 山东烟台人, 助教, 硕士, 从事生物化学与分子生物学研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事软体动物分子系统学、海产贝类养殖与病害防治工作。
收稿日期 2018-06-05

进行 pair end 双端模式 (PE250) 测序。

1.2.3 原始数据的预处理及拼接组装。 测序后得到原始图像数据转化成序列数据 (Raw data 或 Raw reads), 原始测序数据中包含接头信息、低质量碱基和未测出的碱基, 通过深度质量控制 (QC) 过滤筛选, 最终得到的数据即为有效数据 (Clean data 或 Clean reads)。统计原始测序数据量以及经过碱基质量控制处理后 reads 平均长度、reads 总数目和总数据量产出等信息。根据样本经过质量控制分析所保留下来的测序 reads 数据进行样本转录组拼接组装。利用 Trinity 生物分析软件将短的读长拼接, 得到组装片段 (Contig), 将 Contig 互相拼接, 最后得到具有一定长度的非冗余 Unigene。

1.2.4 Unigene Pathway 生物通路注释。 KEGG 是系统研究基因的生物代谢途径和相关基因功能的大型数据库, 利用 KEGG 数据库对合并拼接的 Unigene 进行 Pathway 生物学通路的注释和预测。通过 KEGG pathway 注释, 对免疫相关基因数目进行统计。

1.2.5 差异基因的筛选及表达量分析。 将拼接序列与基因组序列比对, 利用编码 RNA 表达计算, 这是通过统计方法估计的表达量, 也用于后续样本差异表达量比较分析。RNA 表达量的计算采用 FPKM 计算度量指标。表达量的计算有多种标准化方法, 采用参考基因区域内匹配 read 标准化模式 (cufflink 软件) 计算表达量与差异基因表达。

针对 isoform (即 Unigene) 以及 gene (即 components) 分别进行表达量计算。表达量用 PFKM 表示, 并给出 unigene 对

应 NR 与 Uniprot 蛋白数据库的最佳匹配结果作为其注释。表达差异分析就是组间差异表达谱分析。差异分析可分别对基因 (gene FPKM) 和基因异构体 (isoform FPKM, 即 components) 层面分别进行考虑计算。差异分析采用 edgeR 软件, 在 R 软件环境下实现。表达量差异倍数大于 2 ($FPKM \geq 2$) 且 $FDR < 10^{-5}$ 作为筛选标准。

1.2.6 Unigene 差异表达基因 GO 功能分析。 分别对 Unigene 进行 gene 以及 isoform 差异结果的 GO 富集度分析。GO 功能聚类常用于对目标组基因进行功能注释与分类。全部或差异 mRNA/基因功能聚类 (富集度) 分析是采用 GO 注释系统, 功能注释针对全部差异 mRNA 结果展开。富集度分析采用超几何分布算法和并采用多重假设检验校正超几何分布统计量的 P 值, 获得校正后 P 值, 即 q 值。

2 结果与分析

2.1 测序数据量统计 对青蛤被藤黄微球菌刺激的样本 (样本 T) 进行测序, 共获得 12 916 040 条 Raw reads, 去除低质量的和载体序列等, 共 10 966 322 条 Clean reads (表 1)。青蛤被鳗弧菌刺激的样本 (样本 M) 测序, 共获得 15 930 210 条 Raw reads, 去除低质量的和载体序列等, 共 13 389 388 条 Clean reads (表 2)。样本 T 的测序原始数据量为 3.22 G, 平均 Q20 为 88.62 %, GC 含量平均值为 43.10 %; 样本 M 的测序原始数据量为 3.98 G, 平均 Q20 为 87.72 %, GC 含量平均值为 42.67 %。转录组测序质量高, 建库成功。

表 1 测序数据统计 (样本 T)
Table 1 Sequencing data statistics (sample T)

项目 Item	Raw reads	Raw data//bp	Raw reads 平均长度 Mean length of Raw reads	Clean reads	Clean data bp	Clean reads 平均长度 Mean length of Clean reads
Reads 1	6 458 020	1 614 505 000	250	5 483 161	1 191 483 803	217
Reads 2	6 458 020	1 614 505 000	250	5 483 161	1 123 004 994	205
合计 Total	12 916 040	3 229 010 000	500	10 966 322	2 314 488 797	422

注: Raw reads. 原始 read 总数目; Raw data. 原始 read 总数据量; Clean reads. 经过碱基质量处理后 reads 总数目; Clean data. 经过碱基质量处理后 reads 总数据量
Note: Raw reads. total number of raw reads; Raw data. total base pair number of raw reads; Clean reads. total number of reads after base quality processing; Clean data. total base pair number of reads after base quality processing

表 2 测序数据统计 (样本 M)
Table 2 Sequencing data statistics (sample M)

项目 Item	Raw reads	Raw data//bp	Raw read 平均长度 Mean length of Raw reads	Clean reads	Clean data bp	Clean reads 平均长度 Mean length of Clean reads
Reads 1	7 965 105	1 991 276 250	250	6 694 694	1 449 153 940	216
Reads 2	7 965 105	1 991 276 250	250	6 694 694	1 359 215 082	203
合计 Total	15 930 210	3 982 552 500	500	13 389 388	2 808 369 022	419

注: Raw reads. 原始 read 总数目; Raw data. 原始 read 总数据量; Clean reads. 经过碱基质量处理后 reads 总数目; Clean data. 经过碱基质量处理后 reads 总数据量
Note: Raw reads. total number of raw reads; Raw data. total base pair number of raw reads; Clean reads. total number of reads after base quality processing; Clean data. total base pair number of reads after base quality processing

2.2 转录组测序数据的组装拼接效果统计 M 样本转录组序列组装拼接完成的总转录本数量为 148 238 条, 拼接完成的总基因数量为 62 152 条, 转录本长度均值 (average contig) 约 618.50 bp。T 样本转录组序列组装拼接完成的总转录本数量为 137 940 条, 拼接完成的总基因数量为 57 877 条, 转录本长度平均值 (average contig) 约 644.32 bp。

2.3 免疫相关基因数目统计 通过 KEGG pathway 注释 (E 值 $\leq 10^{-5}$ 作为筛选标准), 共 893 个基因注释到 15 个免疫相关 pathway, T 细胞受体信号通路的免疫防御基因居多, 其次是趋化因子信号通路, 白细胞跨内皮迁移, $Fc\gamma R$ 介导的吞噬作用及 Toll 样受体信号通路中也包含大量免疫防御相关基因 (表 3)。经序列同源性比较、功能基因注释和代谢途径分

析,此次转录组测序中发掘青蛤免疫防御系统的相关抗病因子,主要有热冷休克蛋白家族、亲环素、非消化性的酶和酶抑制剂家族、抗菌肽家族、Toll 样受体家族及其下游信号因子等。

表 3 免疫相关 pathway 包含免疫相关基因数目分布
Table 3 The distribution of immune-related genes on immunological pathway

序号 No.	免疫相关通路 Immune-related pathway	注释基因数目 Number of annotated genes
1	造血细胞谱系 Hematopoietic cell lineage	37
2	补体系统 Complement and coagulation cascades	48
3	Toll 样受体信号通路 Toll-like receptor signaling pathway	115
4	NOD 样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	100
5	RIG-I 受体信号通路 RIG-I-like receptor signaling pathway	79
6	胞浆 DNA 传感通路 Cytosolic DNA-sensing pathway	79
7	天然杀伤细胞介导细胞毒性 Natural killer cell mediated cytotoxicity	97
8	抗原加工提呈 Antigen processing and presentation	76
9	T 细胞受体信号通路 T cell receptor signaling pathway	292
10	B 细胞受体信号通路 B cell receptor signaling pathway	102
11	FcεRI 信号通路 Fc epsilon RI signaling pathway	83
12	FcγR 介导的吞噬作用 Fc gamma R-mediated phagocytosis	129
13	白细胞跨内皮迁移 Leukocyte transendothelial migration	143
14	IgA 生产的肠道免疫网络 Intestinal immune network for IgA production	9
15	趋化因子信号通路 Chemokine signaling pathway	171

2.4 Unigene 差异表达分析 由图 1 可知,青蛤经过革兰氏阳性菌藤黄微球菌和革兰氏阴性菌鳃弧菌的分别刺激,共得到 2 605 个差异表达基因,其中 1 091 个基因样品 M 中上调表达(样品 T 中下调)和 1 514 个基因在样品 T 中上调表达(样品 M 中下调)。

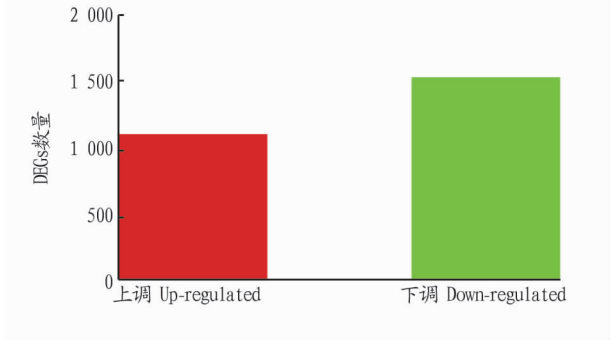


图 1 unigene 差异数量统计
Fig.1 The number statistics of differential unigene

2.5 差异表达基因 Pathway 功能富集分布 由图 2 可知,共 1 942 个差异基因被注释到 KEGG 并显著富集到 110 个 pathway。差异基因主要集中在以下通路:亨廷顿氏病、帕金森病、非酒精性脂肪性肝病、抗原加工提呈、类风湿性关节炎。差异基因被富集到 110 个 pathway 中,有 11 个 pathway 与免疫相关(该研究中有 15 个与免疫相关 pathway 被注释到)。它们分别为造血细胞谱系、补体系统、Toll 样受体信号通路、RIG-I 样受体信号通路、自然杀伤细胞介导细胞毒性、抗原加工提呈、B 细胞受体信号通路、FcεRI 信号通路、FcγR-介导吞噬、白细胞跨内皮迁移、趋化因子信号通路。

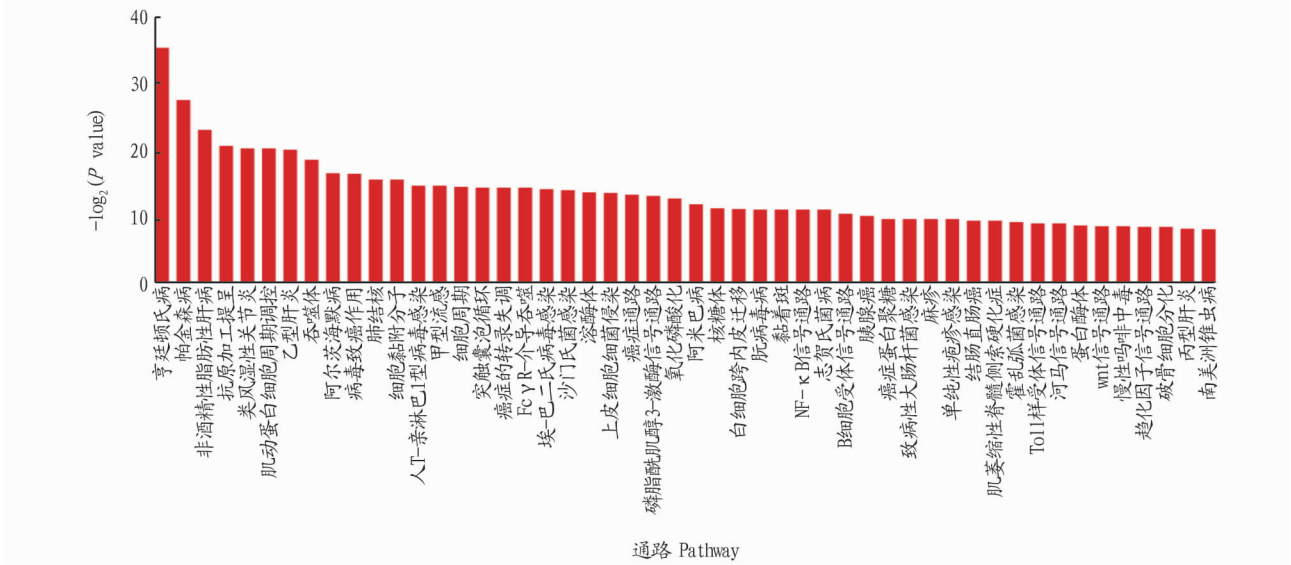


图 2 unigene 差异基因 pathway 注释分布
Fig.2 Pathway annotation distribution of unigene differential unigene

3 讨论与结论

青蛤是具有高经济价值的海洋经济动物,近年来研究表明,引发青蛤养殖大规模病害和死亡的最主要因素是病原菌的感染^[8]。目前研究表明微球菌可以引发水产动物发生疾病,如变异微球菌(*Micrococcus varians*)是牙鲆出血病的病原

菌,患病牙鲆会表现出上下颌出血发红,体表弥散性出血。与水产动物病害相关的革兰氏阳性菌广泛分布并造成大面积病害,如藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)分散在水、土壤、空气、植物和动物表面,一般会引起伤口等局部组织的感染,也可能会引起严重感染^[9-10]。彭彬等^[11]从患出血性疾病的黄

鳃体内首次分离到藤黄微球菌,这也是首次在水生动物体内分离到病原菌藤黄微球菌。革兰氏阳性菌生长过程中细胞会分泌外毒素,会引起机体的免疫反应,一定时间内大量免疫活性物质活性将在一定程度上升。鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是青鳉疾病的重要病原微生物,鳃弧菌的致病性与其自身的一些有毒物质有关^[12],在脂多糖、胞外蛋白酶、溶血素等许多毒力因子的共同作用下,引发青鳉大规模病害甚至死亡的现象^[13]。弧菌的致病过程首先通过吸附宿主细胞,侵入细胞中,在体内大量进行增殖,发出有毒的物质进而导致宿主死亡^[14]。笔者所在课题组前期研究表明一定浓度的鳃弧菌胁迫青鳉后,其会产生大量免疫相关的活性物质,相关免疫基因的表达也会发生一定程度的上调^[15-17]。

为深入探索导致贝类病害和死亡的主要病原细菌及动物的抗逆机制,国内外对于贝类转录组的研究已有报道^[18],包括对多种经济贝类进行了高通量测序,均获得了大量的EST序列。贝类免疫系统中的免疫防御相关的抗病因子,包括免疫识别信号Toll样受体因子及其免疫信号通路以及下游的热休克蛋白、亲环素、非消化性的酶和酶抑制剂、抗菌肽等,为探索贝类免疫应答方式、免疫识别防御系统及其调控网络提供了大量有价值的实验数据。该研究利用第二代高通量测序技术对青鳉的血淋巴细胞的转录组文库进行建库及注释分析,在确保获得的转录组拼接结果良好的条件下,共筛选到893个免疫相关基因,并将其注释到15个免疫相关的信号通路中。综合序列同源性比较和功能基因注释信息,发现青鳉多种免疫防御相关抗病基因,特别是在Toll样受体信号通路中,MyD88样转接蛋白(Mal)、Trif相关转接分子(TRAM)、泛素连接酶(TRAFF6)、转录因子NF- κ B及抑制物I κ B等免疫相关基因在此次青鳉转录组测序中首次被拼接和注释到,为后续研究青鳉Toll信号通路信号传导机制奠定重要基础^[19]。

在水产动物的免疫研究中,采用外界病原生物刺激的方法获得大量差异表达基因,这为后期综合分析其免疫应答方式和免疫防御提供数据支持。Astrofsky等^[20]将白斑病毒感染后的蓝虾与健康蓝虾进行基因表达差异比较,获得32个差异表达基因,其中某些差异表达基因与提高蓝虾抗病能力密切相关,该研究为选育抗病品种奠定坚实基础。Huvet等^[21]利用亮弧菌分别刺激抗性牡蛎和易感性牡蛎,通过基因表达的比较分析,共获得150个差异表达基因,经分析抗性牡蛎和易感性牡蛎存在免疫防御功能方面存在差异。该研究利用革兰氏阳性菌和阴性菌刺激青鳉后,从构建的转录组文库中拼接获得了2605个差异表达基因。在上述差异表达基因中,有1091个基因在样品M中上调表达(相对于样品T),而1514个基因在样品T中上调表达(相对于样品M)。此外,通过对差异基因Pathway功能富集,其中共有

1942个差异基因显著富集到110个通路中,其中有11个pathway跟免疫相关。上述试验结果表明青鳉为应答不同病原物的入侵,不同免疫因子参与免疫应答反应,而特定基因的差异性表达证明其对于革兰氏阳性菌和阴性菌的识别和清除作用有一定的差异。综上所述,该研究结果为后期研究青鳉的先天性免疫的应答机制以及病害防治提供新途径。

参考文献

- [1] 王斌,王翔,王莉明.我国主要养殖贝类微生物性疾病研究进展[J].海洋环境科学,2002,21(3):76-80.
- [2] 孙国铭,万夕和,刘培庭,等.通州海区滩涂青鳉死亡原因的初步分析[J].水产养殖,2004,25(2):26-27.
- [3] 曹华.沿海滩涂青鳉死亡原因初探及对策[J].科学养鱼,2004(4):47-48.
- [4] 王兰萍,耿荣庆,陈燕,等.滩涂养殖青鳉体内细菌菌群的初步分析[J].江苏农业科学,2007(2):152-153.
- [5] HOU R,BAO Z M,WANG S,et al. Transcriptome sequencing and de novo analysis for Yesso scallop (*Patinopecton yessoensis*) using 454 GS FLX[J]. PLoS One,2001,6(6):1-8.
- [6] HUAN P,WANG H X,LIU B Z. Transcriptomic analysis of the clam *Meretrix meretrix* on different larval stages[J]. Marine biotechnology, 2012, 14(1):69-78.
- [7] 高玮玮,潘宝平.青鳉(*Cyclina sinensis*) cDNA 文库构建及免疫相关因子基因的筛选[J].海洋与湖沼,2013,44(1):90-94.
- [8] 于瑞海,王如才,田传远,等.栉孔扇贝大面积死亡原因分析及预防的探讨[J].海洋湖沼通报,1998(3):69-72.
- [9] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:117-118.
- [10] 郭青,钱鸣亮,俞开康.牙鲆出血性败血病病原菌的初步研究[J].湛江海洋大学学报,2000,20(1):9-14.
- [11] 彭彬,杨光友,陈晓利,等.黄鳃藤黄微球菌的分离鉴定及药敏试验[J].上海海洋大学学报,2011,20(3):406-411.
- [12] 陈吉祥,于德华,李筠.鱼类病原鳃弧菌致病相关因子及分子生物学[J].海洋科学,2003,27(8):11-15.
- [13] 葛端阳,赵婷,潘宝平.鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)对青鳉(*Cyclina sinensis*)的毒性及半数致死浓度研究[J].海洋与湖沼,2012,43(6):1192-1195.
- [14] BOWER S M,MCGLADDERY S E,PRICE I M. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish[J]. Annual review of fish diseases,1994,4:1-199.
- [15] 潘宝平,宋欣,罗凯娅,等.青鳉(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达[J].海洋与湖沼,2010,41(6):901-906.
- [16] 任毅鹏,高晶,潘宝平,等.青鳉(*Cyclina sinensis*)TLR2基因的克隆与表达分析[J].海洋与湖沼,2014,45(5):1037-1043.
- [17] 丁丹,潘宝平,王玉梅,等.青鳉(*Cyclina sinensis*)AP-1基因的克隆及在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染下的表达分析[J].海洋与湖沼,2018,49(1):192-197.
- [18] 刘敏,叶晟,杨凤,等.高通量测序技术及其在贝类转录组研究中的应用[J].安徽农业科学,2017,45(7):130-133,192.
- [19] BELL J K,MULLEN G E D,LEIFER C A,et al. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors[J]. Trends in immunology, 2003,24(10):528-533.
- [20] ASTROFSKY K M,ROUX M M,KLIMPEL K R,et al. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. Archives of virology, 2002, 147(9):1799-1812.
- [21] HUVET A,HERPIN A,DÉGREMONT L,et al. The identification of genes from the oyster *Crassostrea gigas* that are differentially expressed in progeny exhibiting opposed susceptibility to summer mortality[J]. Gene,2004,343(1):211-220.