

基于转录组测序方斑东风螺 LPS 刺激的免疫机制研究

陈宗发, 洪雨洁, 赵明明, 王 菁, 王忠良*

(广东海洋大学水产学院, 广东湛江 524088)

摘要 [目的]进一步挖掘方斑东风螺(*Babylonia areolata*)免疫系统中参与响应脂多糖刺激的重要功能基因与通路。[方法]采用 Illumina HiSeq™ 2000 高通量测序平台对不同处理条件的方斑东风螺进行测序分析。所得的原始数据经质控、组装后分别比对到 KOG、Nr、Swiss-Prot 和 KEGG 数据库进行功能注释,筛选差异表达基因并进行聚类分析。[结果]GO 功能注释结果显示,多数 unigenes 被注释到代谢过程(metabolic process)、催化活性(catalytic activity)和细胞过程(cellular process)。KEGG 注释结果显示,多数差异表达基因集中于代谢通路(Metabolic pathways)(28.3%)、次生代谢物的生物合成(Biosynthesis of secondary metabolites)(8.69%)、核糖体(Ribosome)(7.47%)和内存作用(Endocytosis)(5.84%)。对比对照组,试验组中 LPS 刺激后 4 h 组具有 9 096 个差异表达基因,8 h 组具有 10 335 个差异表达基因,而 4 h 组和 8 h 组间则存在 8 756 个差异表达基因,通过 KEGG 数据库对 DEGs 进行注释和功能富集,关注到的显著通路包括 NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路等。[结论]暗示脂多糖调节方斑东风螺的抗病能力通过许多通路,是一个复杂的过程,可为进一步研究方斑东风螺的免疫响应机制研究提供理论数据。

关键词 方斑东风螺;转录组;脂多糖;免疫通路

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)04-0085-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.04.021



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Exploration Related to Immune Mechanism of *Babylonia areolata* in Response to LPS Challenged Based on Transcriptome Sequencing

CHEN Zong-fa, HONG Yu-jie, ZHAO Ming-ming et al (Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract [Objective] To further explore the important functional genes and pathways involved in the immune mechanism stimulated by LPS. [Method] The transcriptomes of foot of *Babylonia areolata* were sequenced through high-throughput sequencing technology. After trimming and filtering, the original data were compared to KOG, Nr, Swiss-Prot and KEGG databases for functional annotation and differential gene cluster analysis. [Result] The results of GO functional annotation showed that most of the unigenes were annotated to metabolic process, catalytic activity and cellular process. KEGG pathway annotations showed that most differentially expressed genes were mainly concentrated in Metabolic pathway (28.3%), biosynthesis of secondary metabolites (8.69%), ribosome (7.47%) and endocytosis (5.84%). Compared with the control group, there were 9 096 differentially expressed genes in the experimental group at 4 h after LPS stimulation, 10 335 differentially expressed genes at 8 h after LPS stimulation, and 8 756 differentially expressed genes at 4 h and 8 h after LPS stimulation. DEGs was annotated and functionally enriched by KEGG database, including nod-like receptor signal pathway, chemokine signal pathway and so on. [Conclusion] The results of this study enrich the genetic resources of *Babylonia areolata*, and provide basic theoretical data for further study of the immune response mechanism of *Babylonia areolata*.

Key words *Babylonia areolata*; Transcriptome; LPS; Immune pathway

方斑东风螺(*Babylonia areolata*)俗称花螺,属软体动物门腹足纲前鳃亚纲新腹足目蛾螺科东风螺属^[1],主要分布于环西太平洋。其生产周期短,具有肉质劲道、味道鲜美、营养价值丰富等优点^[2]。但是随着方斑东风螺养殖的快速发展,育苗与养殖过程中病害暴发日趋严重^[3],其病害主要以革兰阴性菌感染为主^[4-6]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞壁外膜结构的重要组成部分,可作用于不同生物细胞而表现出多种生物活性^[7]。朱璐璐^[8]研究发现,饲料中添加 LPS 能提高凡纳滨对虾对 WSSV 和副溶血弧菌的抵抗力,周妍英等^[9]研究发现,脂多糖可以诱导河南华溪蟹提高血淋巴细胞酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、溶菌酶活性和酚氧化酶活性,从而增强其免疫能力,被广泛应用于水生动物的免疫学研究,揭示 LPS 刺激对方斑东风螺转录组的影响,有助于培

育抗病品种。

转录组测序(RNA-seq)是一种利用深度测序技术进行转录组分析的方法^[10]。转录组是随着生物生长发育阶段、生理状态和外界环境的改变而变化的^[11],因此转录组测序在水生生物的生长^[12]、免疫^[13]、适应^[14]等方面的研究中得到了广泛应用。吴勇等^[15]通过 RNA-seq 测序研究马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)血细胞中存在的补体系统组分,结果表明其补体系统可能通过凝集素途径或替代途径发挥生物学功能;张中日^[16]通过转录组测序分析得出,氰氟草酯使斑马鱼(*Brachydanio rerio* var)的差异表达基因在药物等代谢途径、代谢-细胞色素 P450、抗生素的生物合成和外来物质的代谢等途径明显富集;张恒泽等^[17]通过转录组测序,揭示了大黄鱼(*Larimichthys crocea*)对致病性假单胞菌(LAV)的免疫应答机制, LAV 免疫有效激发鱼体的细胞免疫应答,有助于快速清除胞内病原。笔者以方斑东风螺为试验对象,经 LPS 注射后,利用 RNA-seq 技术获得转录本后,通过 DEGs 的表达分析和功能富集分析,揭示 LPS 调控方斑东风螺 DEGs 的功能和通路。该研究有助于全面深入了解细菌对方斑东风螺发生发展的分子机制,为方斑东风螺的遗传改良提供理论基础,对其养殖产业健康持续发展有现实意义。

基金项目 广东省省级科技计划项目(国际科技合作领域)(2019A050510044); 2021 年度广东省普通高校特色创新类项目(2021KTSCX044); 广东省自然科学基金项目(2019A1515011875); 广东海洋大学 2019 年“冲一流”省财政专项资金建设项目(校[2019]21 号); 国家级大学生创新创业训练计划项目(CXXL2020002); 广东海洋大学“南海学者计划”(2017 年度); 广东海洋大学 2021 年度本科生创新团队项目(CXTD2021001)。

作者简介 陈宗发(1998—),男,福建安溪人,硕士研究生,研究方向:水产动物繁育与养殖。*通信作者,副教授,从事水产经济动物功能基因与基因组学研究。

收稿日期 2022-04-20

1 材料与方法

1.1 材料 方斑东风螺购自广东省湛江市某东风螺养殖场,平均体质量为 25 g,于实验室海水桶中暂养 7 d(80 L, 25 ℃)。将方斑东风螺随机分为试验组 and 对照组,试验组对方斑东风螺注射 100 μL 0.5 mg/mL LPS 悬浮液,对照组注射同体积的 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS),分别于刺激后 4、8 h(分别记为 LPS-4 h、LPS-8 h 组)采集各组足组织样品,于液氮中速冻,置-80 ℃下保存,用于转录组分析。

1.2 转录组测序 转录组文库的制备及测序由广州基迪奥生物科技有限公司完成。使用 TRIzol 法提取总 RNA,利用 NanoDrop 2000 检测所提 RNA 的纯度,利用 Agilent 2100 检测所提 RNA 的浓度,同处理组 10 个个体样本合并后进行建库测序,用带有 Oligo(dT)的磁珠富集 mRNA。加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段,以 mRNA 为模板,用六碱基随机引物(random hexamers)合成第 1 条 cDNA 链,然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA polymerase I 合成第 2 条 cDNA 链,经过 QiaQuick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱后进行末端修复、加 poly(A)并连接测序接头,然后用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增,建好的测序文库用 Illumina HiSeqTM2000 进行测序,测序读长为双端 150 bp。

1.3 转录组数据分析 测序仪产生的原始图像数据转化为序列数据(raw reads),经过初步的过滤后得到质控数据(clean data 或 clean reads),再对下机的 clean reads 去除含有

带接头、重复、测序质量很低的 reads,最后得到高质量的质控数据(clean reads)。通过 Trinity^[18] 软件进行转录组从头组装。通过 BLAST^[19] 将 Unigene 序列比对到蛋白数据库 nr、SwissProt、KEGG 和 COG/KOG (evalue<1×10⁻⁵),得到与给定 Unigene 具有最高序列相似性的蛋白,从而得到该 Unigene 的蛋白功能注释信息。

1.4 差异表达基因(DEGs)分析 采用短 reads 比对软件 Bowtie2^[20] 将高质量质控数据与参考基因序列进行对比,根据对比结果,使用 RPKM 法(Reads Per kb per Million reads)计算 Unigene 的表达量。利用 edgeR^[21] 进行 RNA-seq 数据成对样本之间或组间的差异表达分析,获得不同时间梯度的 DEGs。在筛选过程中,利用 FDR 与 log2FC 筛选 DEGs,筛选条件为 FDR<0.05 且 |log2FC|>1。得到 DEGs 后,对 DEGs 进行 GO 功能注释分析及 KEGG Pathway 富集分析。

2 结果与分析

2.1 测序结果统计及质量评估 用 Illumina HiSeqTM 2000 分别对方斑东风螺 LPS 空白对照组(BLANK)、LPS 刺激 4 h 后取样组(LPS-4 h)和 LPS 刺激 8 h 后取样组(LPS-8 h)测序,共构建了 3 个转录组文库,共获得 81 773 条 unigenes,序列平均长度 681 bp,序列长度中位数(N50)为 1 035 bp,每组 GC 含量为 46.15%~47.81%,过滤后的 clean reads 在 97.58%~97.74%, Q20 均不小于 98.49%, Q30 均不小于 95.40%(表 1),说明测序质量良好,能进行后续的数据分析^[22]。从长度分布(图 1)与 GC 含量等方面对 unigenes 进行评估,数据显示测序质量好,可信度高。

表 1 转录组测序数据评估统计
Table 1 Summary of RNA-seq data assessment

样品 Sample	过滤后 序列数量 Clean reads	读长 Reads	Q20 含量 Q20 content %	Q30 含量 Q30 content %	GC 含量 GC content %	比对到参考基因 组的过滤后序 列数量(比速率) Mapped reads (Mapping rate) // %
LANK	56 424 638	150	98.49	95.40	47.81	88.73
LPS-4 h	50 596 990	150	98.57	95.61	46.15	89.60
LPS-8 h	49 924 362	150	98.49	95.40	46.88	90.04

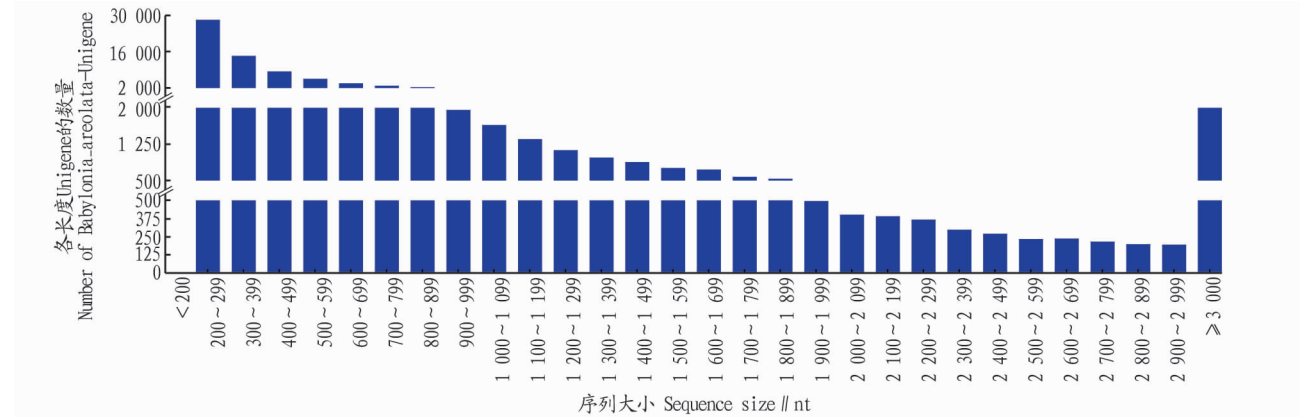


图 1 方斑东风螺 unigenes 的长度分布

Fig.1 Length distribution of unigene sequence in *B. areolata*

2.2 Unigene 功能注释 使用 4 大数据库 (KOG、Nr、Swiss-Prot 和 KEGG) 注释方斑东风螺转录组 unigenes, 分别对应有 13 256、21 702、15 335 和 11 417 条 unigenes 获得注释。其中, 9 280 条 unigenes 在以上所有数据库中同时注释成功, 21 938 条 unigenes 至少被 1 个数据库注释。

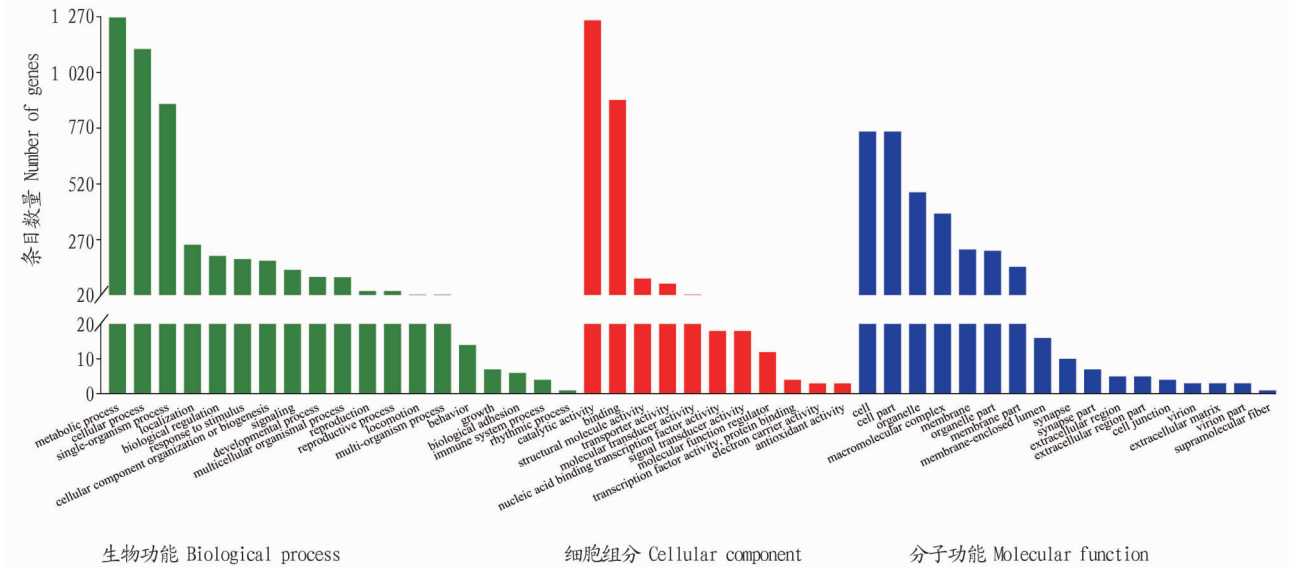


图 2 方斑东风螺 GO 功能注释图
Fig.2 GO function annotation of *B. areolata*

2.3 DEGs 分析 KEGG 数据库结果显示, DEGs 富集在 5 个 A 级 KEGG 通路, 33 个 B 级 KEGG 通路, 232 个 C 级 KEGG 通路中。其中, 5 个 A 级 KEGG 通路分别为新陈代谢、遗传信息处理、环境信息处理、细胞进程和有机系统。在 232 个 C 级 KEGG 通路 (表 2) 中, 共富集到 5 141 个基因, 其中参与代谢通路的基因数量最多, 共有 1 455 个 (28.30%), 参与次生代谢物的生物合成的基因有 447 个 (8.69%), 参与核糖体的基因有 384 个 (7.47%), 参与内吞作用的基因有 300 个 (5.84%), 参与抗生素生物合成的基因有 276 (5.37%), 参与

表 2 方斑东风螺转录组 Unigene 的 KEGG 功能分类统计 (前 10 个)

Table 2 KEGG functional classification statistics for <i>B. areolata</i>			
序号 No.	通路 Pathway	注释基因数目 Number of genes annotation	占比 Proportion//%
1	代谢途径 Metabolic pathways	1 455	28.30
2	次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of secondary metabolites	447	8.69
3	核糖体 Ribosome	384	7.47
4	内吞作用 Endocytosis	300	5.84
5	抗生素生物合成 Biosynthesis of antibiotics	276	5.37
6	泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis	261	5.08
7	内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	234	4.55
8	不同环境中的微生物代谢 Microbial metabolism in diverse environments	227	4.42
9	尿代谢 Purine metabolism	225	4.38
10	RNA 转运 RNA transport	204	3.97

通过转录组测序中的 unigenes 与 GO 数据库的比对, 得知在被 unigenes 注释的 47 个功能条目中, 包括生物功能 (生长、定位等)、细胞组分 (细胞器、高分子配合物等)、分子功能 (装订、运输等) 3 个亚类。分析显示, 生物功能含 19 个功能条目, 细胞组分含 17 个功能条目, 分子功能含 11 个条目 (图 2)。

泛素介导的蛋白水解的基因有 261 个 (5.08%)。利用 edgeR^[21] 进行 RNA-seq 数据成对样本之间或组间的差异表达分析, 利用 FDR 与 log2FC 筛选 DEGs, 筛选条件为 FDR<0.05 且 |log2FC|>1。在 BLANK vs. LPS-4 h 时, 显著 DEGs 的表达情况为: 9 096 个显著 DEGs 中 4 754 个上调, 4 342 个下调; 在 BLANK vs. LPS-8 h 时, 显著 DEGs 的表达情况为: 10 335 个显著 DEGs 中 4 631 个上调, 5 704 个下调; 在 LPS-4 h vs. LPS-8 h 时, 表达情况为: 8 756 个显著 DEGs 中 3 475 个上调, 5 281 个下调 (图 3)。

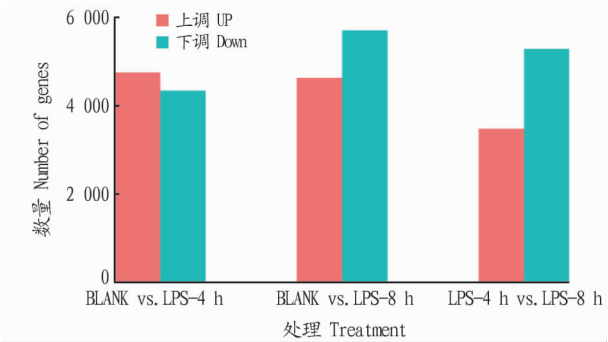


图 3 样品间 DEGs 统计
Fig.3 Statistics of DEGs between samples

2.4 DEGs 的 GO 和 KEGG 注释 在 DEGs 的 GO 分类图 (图 4) 中, 横坐标为二级 GO term, 纵坐标为该 term 的基因数量, 红色代表基因上调, 绿色代表基因下调。结果显示, 在 BLANK vs. LPS-4 h 组中, 在生物功能中, 细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process) 和单组织过程 (Single organism process) 基因的上调与下调较多; 在细胞组分中, 细

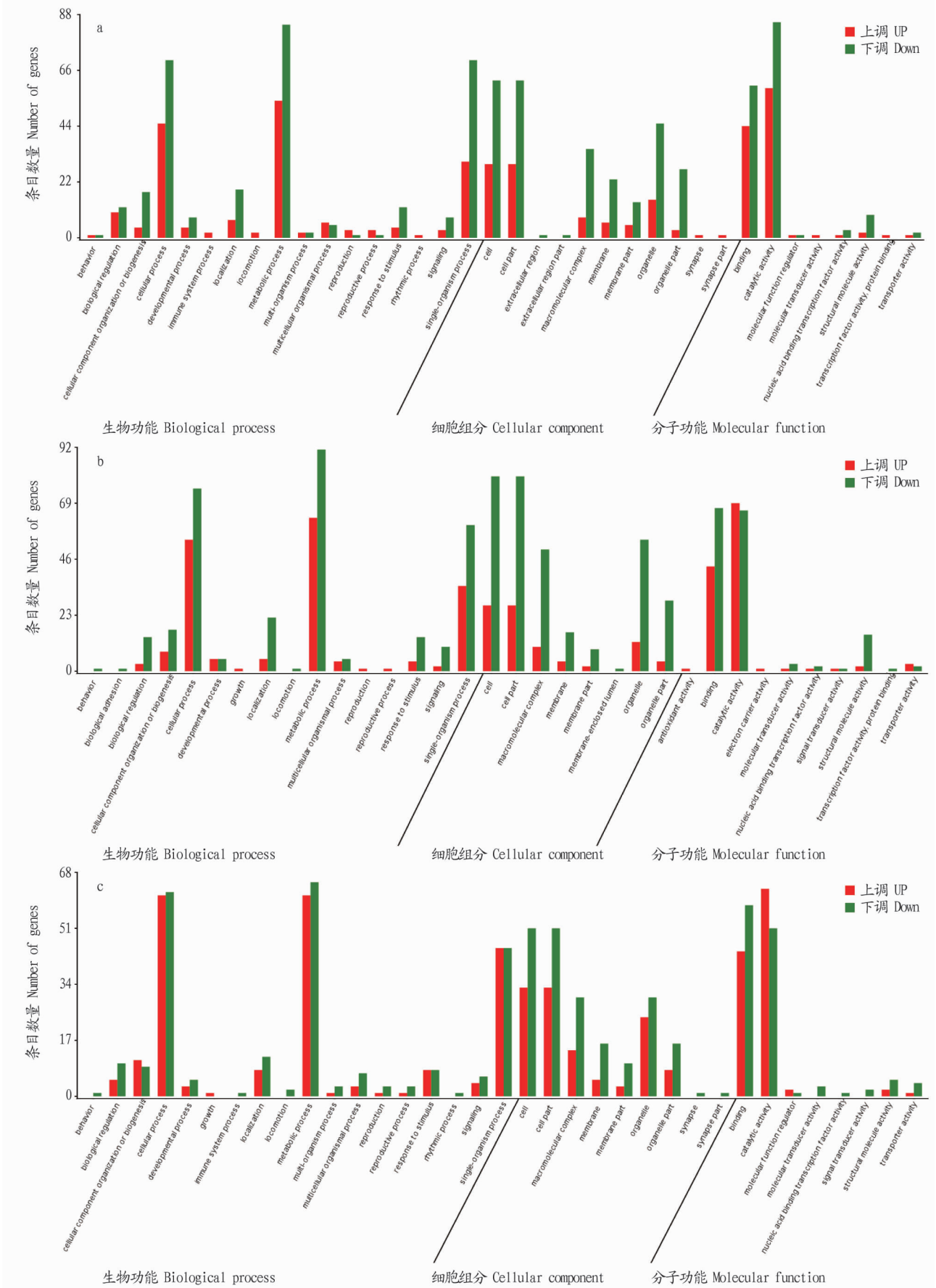


图 4 BLANK vs.LPS-4 h (a)、BLANK vs.LPS-8 h (b) 和 LPS-4 h vs.LPS-8 h (c) 的差异基因 GO 分类图

Fig.4 GO classification maps of differential genes BLANK vs.LPS-4 h (a), BLANK vs.LPS-8 h (b) and LPS-4 h vs.LPS-8 h (c)

胞 (Cell)、细胞部分 (cell part) 和细胞器 (organelle) 基因的上调与下调较多;而在分子功能中,基因的上调与下调主要集中在绑定 (binding)、催化活性 (catalytic activity) 方面 (图 4a)。在 BLANK vs.LPS-8 h 组中,在生物功能中,细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process) 和单组织过程 (single organism process) 基因的上调与下调较多;在细胞组分中,细胞 (cell)、细胞部分 (cell part)、大分子配合物 (macromolecular complex) 和细胞器 (organelle) 的上调与下调较多;而在分子功能中,基因的上调与下调主要集中在绑定 (binding)、催化活性 (catalytic activity) 方面 (图 4b)。在 LPS-4 h vs.LPS-8 h 组中,在生物功能中,细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process) 和单组织过程 (single organism process) 基因的上调与下调较多;在细胞组分中,细

胞 (cell)、细胞部分 (cell part)、大分子配合物 (macromolecular complex) 和细胞器 (organelle) 的上调与下调较多;而在分子功能中,基因的上调与下调主要集中在绑定 (binding)、催化活性 (catalytic activity) 方面 (图 4c)。

对 BLANK、LPS 刺激 4 h 和 8 h 的 DEGs 进行 KEGG 通路富集分析,结果显示,在 BLANK vs.LPS-4 h 组中,在心肌收缩、神经活性配体受体相互作用和代谢途径等 201 个通路中,共富集到 506 个 DEGs (图 5a);在 BLANK vs.LPS-8 h 组中,在谷胱甘肽代谢、核糖体和神经活性配体受体相互作用等 191 个通路中,共富集到 551 个 DEGs (图 5b);在 LPS-4 h vs.LPS-8 h 组中,在 DNA 复制、神经活性配体受体相互作用和鞘糖脂生物合成等 173 个代谢通路中,共富集到 414 个 DEGs (图 5c)。

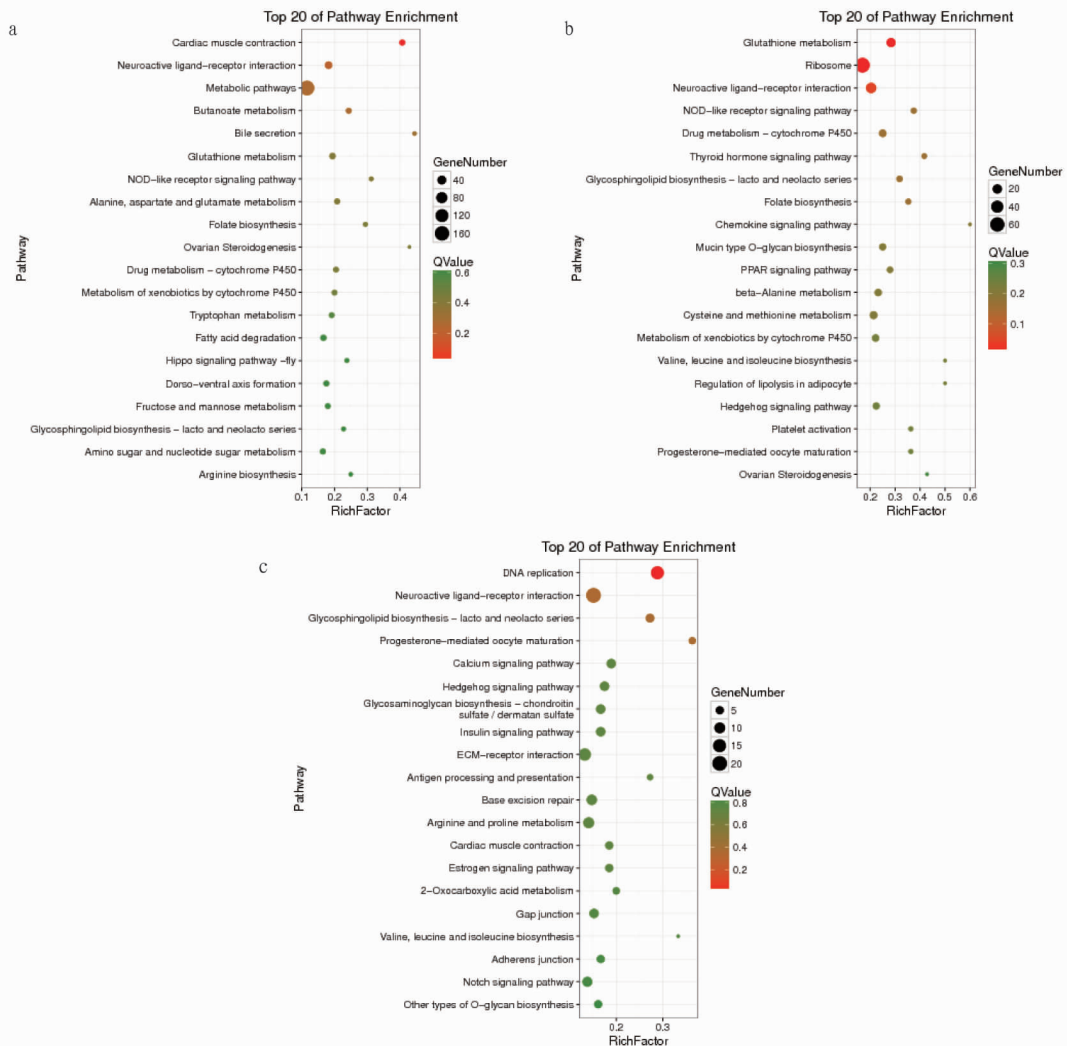


图 5 BLANK vs.LPS-4 h (a)、BLANK vs.LPS-8 h (b) 和 LPS-4 h vs.LPS-8 h (c) 的 KEGG 富集气泡图

Fig.5 KEGG classification maps of differential genes BLANK vs.LPS-4 h (a), BLANK vs.LPS-8 h (b) and LPS-4 h vs.LPS-8 h (c)

根据 DEGs 的 GO 功能分类和 KEGG 富集分析,筛选到 NOD 样受体信号通路、趋化因子信号通路、B 细胞受体信号通路、补体和凝血级联反应、Fc 蛋白 RI 信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号通路、toll 样受体信号通路、rig-i 样受体信号通路、血小板激活、造血细胞系通路和抗原的处理和呈递等免疫信号通路。

3 讨论

转录组学是研究特定细胞、组织或器官在特定生长发育阶段或某种生理状况下所有转录本的学科^[10],基于 RNA-seq 的转录组分析在许多水生生物研究中得到应用,如李喜莲等^[23]通过 RNA-seq 研了罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 不同组织的转录组差异;王菁等^[24]通过转录组测序挖

掘了方斑东风螺 (*Babylonia areolata*) 的单核苷酸多态性位点。该研究利用 RNA-seq 技术, 对方斑东风螺进行了无参转录组测序, 得到 81 773 个 unigenes, 其中得到注释的基因数总共为 21 938 个, 注释率为 26.83%, 注释率较低的原因可能是与方斑东风螺相近的物种在公共数据库中收录较少, 其他无脊椎动物也有注释率较低的情况, 如克氏原螯虾 (*Procambarus clarkii*) 的卵巢、胰腺腺和肌肉组织只有 30.1% 的基因得到注释^[13]。该研究得到的 unigenes 与 Nr 数据库比对结果显示, 与在公共数据库中已注册的方斑东风螺序列匹配的 unigenes 仅有 0.014%, 这说明目前公共数据库中仍缺乏方斑东风螺的基因信息, 该研究是对方斑东风螺基因信息库的有力补充。免疫调控机制一直是贝类研究的热点, 已有研究报道, 贝类的免疫受到免疫细胞、体液和化学递质等的综合调控^[22]。

该试验中, BLANK vs. LPS-4 h 组的 DEGs 显著富集至 NOD 样受体信号通路, 在 NOD 样受体信号通路中筛选到半胱天冬酶 8 (caspase 8; CASP 8)、半胱天冬酶募集域家族 9 (caspase recruitment domain-containing protein 9; CARD 9) 和含有杆状病毒 IAP 重复序列的蛋白质 2/3 (baculoviral IAP repeat-containing protein 2/3; BIRC2_3)。caspase 是一类具有天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶, 参与所有凋亡通路的级联反应, 是细胞凋亡的核心^[25]。Caspase 8 是外源性细胞凋亡途径的关键启动子, caspase 8 酶原通过其上的 DED 与 FADD (fas-associated death domain protein) 的 DED 相结合形成多聚体, 将 caspase 8 酶原招募到细胞质膜上, 形成死亡诱导信号复合物 DISC (death inducing signaling complex), 在复合物中进而形成有活性的 caspase 8, 发生 caspase 级联反应, 启动细胞凋亡^[26]。CARD 9 可与开放的 Apaf-1 结合, 进而与大小亚基结合, 使 caspase 9 得到活化, 启动细胞凋亡^[27]。BIRC2_3 是凋亡相关基因, 其编码的蛋白可抑制细胞凋亡, 其中凋亡抑制因子 (IAP) 是通过抑制半胱天冬酶 (caspases) 的活性而起到抑制凋亡的作用^[28]。有研究者从盘纹罗鲍 (*Halotis diversicolor*) 中鉴定出了 *caspase-3-like* (*saCASP-3lp*) 基因, 并且进一步研究表明 *saCASP-3lp* 可能是 *sacaspase-8* 上游的调节分子, 并参与细胞凋亡过程^[29]。在 BLANK vs. LPS-4 h 组的 BIRC2_3 呈上调, 其通过受体相互作用的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2; RIPK2) 激活 CASP 8 和 CARD 9, CASP 8 和 CARD 9 同样参与了细胞凋亡过程, 其中 CARD 9 激活了 p38、JNK, 最终激活 MAPK 通路, 促进促炎因子的释放, 参与了细胞的凋亡过程^[27]。在 BLANK vs. LPS-8 h 组, 免疫相关 DEGs 同样显著富集至 NOD 样受体信号通路, 但在 NOD 样受体信号通路中除了筛选到 CARD 9 和 BIRC2_3, 还筛选到了热休克蛋白 90 α (molecular chaperone 90 A; HSP90 α)。HSPs 是一类进化上高度保守的蛋白, 可以增强细胞对应激的反应能力^[30]。有研究发现, 缢蛏 (*Sinonovacula constricta*)^[30]、菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)^[31] 在受到胁迫后 HSP90 发生显著变化。在该试验中, HSP90 α 在方

斑东风螺受到 LPS 刺激后亦发生显著变化, 说明 HSP90 α 在 LPS 刺激后的免疫反应中发挥了作用。

在该试验中, BLANK vs. LPS-8 h 组的 DEGs 显著富集到趋化因子信号通路。趋化因子 (chemokine) 是机体重要的免疫调节因子, 可协调免疫细胞迁移^[32]。范婷婷^[33] 在短蛸 (*Octopus ocellatus*) 幼体对鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 感染应答中发现有 3 个差异表达基因 (*Gai*、*PLC β* 、 *β -arrestin*) 在趋化因子信号通路富集。该试验中, 有 *PKA*、*SOS* (son of sevenless)、*CDC42* (cell division control protein 42) 差异表达基因在趋化因子信号通路富集。其中 *CDC42* 和 *Rac1* 是 PAK 的主要激活剂, 通过调控 *PKA* 的表达来抑制肌动蛋白细胞骨架的调节^[34]。从而达到清除病原体和促进创伤组织愈合, 维持组织细胞的平衡的目的^[33], 表明该信号通路可能在方斑东风螺免疫应答过程中发挥重要作用。

在 BLANK vs. LPS-4 h 组的 DEGs 除了显著富集至趋化因子信号通路, 还富集至 B 细胞受体信号通路、补体和凝血级联反应、Fc 蛋白 RI 信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号通路、toll 样受体信号通路、rig-i 样受体信号通路、血小板激活和抗原的处理和呈递等免疫相关 KEGG 通路, 这些通路均与化学递质的传递有关, 在这些通路中筛选出了一些免疫相关的基因, 如 Ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1; *Rac1*)、热休克蛋白 70 (heat shock 70kDa protein 1/2/6/8; *HSPA1s*)、 α -1-抗胰蛋白酶 (α -1-antitrypsin; *Serpina1b*) 和蛋白激酶 A (protein kinase A [EC:2.7.11.11]; *PKA*)。其中, *Rac1* 不仅与 PAK 参与了 MARK 通路的激活, 还通过 JNK 通路来激活炎症反应, 从而在由免疫球蛋白受体所介导的巨噬细胞吞噬作用中起着关键作用^[35]。

在 LPS-4 h vs. LPS-8 h 组的 DEGs 还富集至抗原的处理和呈递通路、NOD 样受体信号通路、造血细胞系和 Toll 样受体信号通路等免疫信号通路。其中, 抗原的处理和呈递通路筛选到 *HSP70*、*HSP90 α* 差异表达基因。其中, *HSP90 α* 基因还被富集至 NOD 样受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。与试验组 LPS-4 h 组相比, *HSP90 α* 表达量下降。在 NOD 样受体信号通路中, 除了筛选到 *HSP90 α* 基因, 还筛选到 *BIRC2_3* 基因。与试验组 LPS-4 h 组相比, *BIRC2_3* 的表达量差异不显著, 在 4 h 时表达量最大。在 Toll 样受体信号通路中筛选到 *Rac1*。与试验组 LPS-4 h 组相比, *Rac1* 表达量下降, 在 4 h 时表达量最大。在造血细胞系通路中筛选到低亲和力免疫球蛋白 ϵ Fc 受体 (low affinity immunoglobulin ϵ Fc receptor; *FCER2*)。Ren 等^[36] 在鳃弧菌感染下菲律宾蛤仔肝胰腺转录组分析中, 同样发现了 8 个 DEGs 在造血细胞系通路中。

该试验注释到了仅存在于脊椎动物中的特定通路和同源基因, 如造血细胞系通路、抗原处理和呈递通路。这些通路和基因的进化关系和免疫相关功能将是未来几年的主要研究领域。

4 结论

根据 GO 功能分类和 KEGG 信号通路分析筛选到 NOD

样受体信号通路、趋化因子信号通路、B 细胞受体信号通路、补体和凝血级联反应、Fc 蛋白 RI 信号通路、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、T 细胞受体信号通路、toll 样受体信号通路、rig-i 样受体信号通路、血小板激活、造血细胞系通路和抗原的处理和呈递等免疫信号通路以及大量与方斑东风螺免疫相关的候选基因,如 *Birc3*、*Rac1*、*hsp-1*、*Serpina1b*、*Casp8*、*BIRC2*、*TPK3*、*TP02_0244*、*ACT1*、*Fcer2*、*Diap2*、*Cdc42*、*CARD11*、*actc1* 和 *HSP70* 等。该研究结果丰富了方斑东风螺的基因资源,可为方斑东风螺的免疫研究提供基础数据。

参考文献

[1] 蔡英亚,张英,魏若飞.贝类学概论[M].上海:上海科学技术出版社,1995.

[2] 杨蕊,吴开畅,于刚,等.养殖模式对方斑东风螺生长及主要环境因子的影响[J].水产科学,2019,38(5):610-615.

[3] 吴开畅,赵旺,杨蕊,等.方斑东风螺主要病害及防治技术研究[R].中国水产科学研究院南海水产研究所热带水产研究开发中心,2017-06-13.

[4] 刘巧红,王世锋,蔡岩,等.海南养殖方斑东风螺暴发性疾病病原分离鉴定及药敏分析[J].渔业科学进展,2014,35(1):74-81.

[5] 王江勇,王瑞旋,苏友禄,等.方斑东风螺“急性死亡症”的病原病理研究[J].南方水产科学,2013,9(5):93-99.

[6] 李淑芳,邱德全,张继东,等.脱壳病和吻肿病东风螺体内致病菌及条件致病菌菌相研究[J].海洋科学进展,2013,31(2):266-272.

[7] PULIDO-SALGADO M, VIDAL-TABOADA J M, BARRIGA G G D, et al. RNA-Seq transcriptomic profiling of primary murine microglia treated with LPS or LPS+ IFN γ [J].Scientific reports,2018,8(1):1-21.

[8] 朱璐璐.脂多糖、肽聚糖和聚肌胞苷酸在凡纳滨对虾中的免疫增强作用研究[D].湛江:广东海洋大学,2021.

[9] 周妍英,王兰.脂多糖对河南华溪蟹免疫能力的调节作用[J].安徽农学通报,2020,26(16):128-131,139.

[10] WANG Z, GERSTEIN M, SNYDER M. RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics[J].Nature reviews genetics,2009,10(1):57-63.

[11] 罗辉,叶华,肖世俊,等.转录组学技术在水产动物研究中的运用[J].水产学报,2015,39(4):598-607.

[12] 崔晓琳,丁志雯,马浩宇,等.瑞士乳杆菌对泥鳅肠道转录组基因表达的影响[J].水产科学,2022,41(3):352-361.

[13] 江红霞,刘慧芬,马晓,等.转录组测序筛选克氏原螯虾卵巢发育、免疫和生长相关基因[J].水产学报,2021,45(3):396-414.

[14] 杨二军,杨林桐,王维政,等.军曹鱼响应低氧胁迫转录组 SNP 位点鉴定及其功能注释分析[J].海洋学报,2022,44(1):113-124.

[15] 吴勇,张野,许尤厚,等.马氏珠母贝(*Pinctada fucata*)血细胞 RNA-Seq 转录组数据中补体样组分分析[J].海洋与湖沼,2019,50(6):1343-1353.

[16] 张中日.转录组测序技术分析氰氟草酯暴露后斑马鱼胚胎的肝毒性和免疫毒性[D].南昌:南昌大学,2020.

[17] 张恒泽,高丽婷,万里,等.假单胞菌减毒活疫苗免疫后的大黄鱼脾脏转录组分析[J].基因组学与应用生物学,2020,39(1):123-131.

[18] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcrip-

tome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J].Nature biotechnology,2011,29(7):644-652.

[19] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs[J].Nucleic acids research,1997,25(17):3389-3402.

[20] LI R Q, YU C, LI Y R, et al. SOAP2: An improved ultrafast tool for short read alignment[J].Bioinformatics,2009,25(15):1966-1967.

[21] CHEN Y S, LUN A T, SMYTH G K. From reads to genes to pathways: Differential expression analysis of RNA-Seq experiments using Rsubread and the edgeR quasi-likelihood pipeline[J].F1000research,2016,5:1-51.

[22] 吴宁,陈梦玫,王素芳.贝类免疫机制的研究进展[J].药物生物技术,2017,24(1):68-71.

[23] 李喜莲,顾志敏,慎佩晶,等.基于 RNA-seq 技术的罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)不同组织转录组比较分析[J].海洋与湖沼,2021,52(1):231-241.

[24] 王菁,刘付柏,许尤厚,等.基于转录组测序的方斑东风螺单核苷酸多态性位点挖掘及功能注释[J].广东海洋大学学报,2021,41(1):111-118.

[25] THORNBERRY N A, LAZEBNIK Y. Caspases: Enemies within[J].Science,1998,281(5381):1312-1316.

[26] 章琼.团头鲂 g 型溶菌酶和 caspase 家族基因的全长 cDNA 克隆及在氨氮胁迫下的表达分析[D].南京:南京农业大学,2015:7-8.

[27] SRINIVASULA S M, AHMAD M, FERNANDES-ALNEMRI T, et al. Auto-activation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization[J].Molecular cell,1998,1(7):949-957.

[28] LI M, LIU Y, WANG Q L, et al. *BIRC7* gene in channel catfish (*Ictalurus punctatus*): Identification and expression analysis in response to *Edwardsiella tarda*, *Streptococcus iniae* and channel catfish Hemorrhage Reovirus[J].Fish & shellfish immunology,2012,33(1):146-153.

[29] HUANG W B, REN H L, GOPALAKRISHNAN S, et al. First molecular cloning of a molluscan caspase from variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*) and gene expression analysis with bacterial challenge[J].Fish & shellfish immunology,2010,28(4):587-595.

[30] 叶博,李燕,牛东红,等.鳗鲡 HSP90 基因的鉴定及其在不同盐度下的表达分析[J].基因组学与应用生物学,2021,40(S2):2414-2421.

[31] 李佳.温度和盐度对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)热休克蛋白家族基因表达的影响[D].大连:大连海洋大学,2016.

[32] LUSTER A D. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate inflammation[J].New England journal of medicine,1998,338(7):436-445.

[33] 范婷婷.短吻幼体对鳃弧菌感染应答的关键免疫基因挖掘[D].上海:上海海洋大学,2019.

[34] WANG Y, GUO F Z. Group I PAKs in myelin formation and repair of the central nervous system: What, when, and how[J].Biological reviews,2022,97(2):615-639.

[35] CARON E, HALL A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases[J].Science,1998,282(5394):1717-1721.

[36] REN Y P, XUE J L, YANG H H, et al. Transcriptome analysis of *Ruditapes philippinarum* hepatopancreas provides insights into immune signaling pathways under *Vibrio anguillarum* infection[J].Fish & shellfish immunology,2017,64:14-23.

(上接第 80 页)

处理的虫体转化率分别为 28.25%、27.35%、28.94%,均与该试验中的饲料系数相近。由此可见,将猪肉添加到黄粉虫饲料中,既可以降低黄粉虫的养殖饲料成本,又为貉屠体资源化利用提供了新途径,进一步减少了面源污染。

参考文献

[1] 刘玉升,王付彬,崔俊霞,等.黄粉虫资源研究利用现状与进展[J].环境昆虫学报,2010,32(1):106-114.

[2] 吉志新,温晓蕾,余金咏,等.喂食玉米秸秆对黄粉虫经济指标的影响[J].安徽农业科学,2011,39(33):20520-20522.

[3] XU S, XI Z, SHEN X, et al. Feed production for *Tenebrio molitor* L. by fermentation of corn stalks[J].Animal husbandry and feed science,2013,5(Z1):244-248.

[4] 温晓蕾,郑国勇,李汉臣,等.饲喂紫红薯藤对黄粉虫营养指标的影响

[J].安徽农业科学,2012,40(28):13835,13864.

[5] 曾祥伟,王霞,郭立月,等.发酵牛粪对黄粉虫幼虫生长发育的影响[J].应用生态学报,2012,23(7):1945-1951.

[6] 陈建兴,萨如拉,李静,等.驴粪作为黄粉虫饲料的研究[J].赤峰学院学报(自然科学版),2017,33(17):9-11.

[7] 陈美玲,凌源智,黄儒强,等.响应面法优化黄粉虫幼虫处理餐厨垃圾饲养条件的研究[J].环境工程学报,2015,9(5):2455-2461.

[8] 郭存雨,黄世臣,张诗焱.黄粉虫幼虫降解不同塑料的研究进展[J].科学技术创新,2019(13):149-150.

[9] 秦梦玲,司增志,曹丽娟,等.饲料中添加甘薯黄粉对黄粉虫生长发育的影响[J].安徽农业科学,2021,49(13):95-97,107.

[10] 徐长勇,宋薇,赵树青,等.餐厨垃圾饲料化技术的同源性污染研究[J].环境卫生工程,2011,19(1):9-10,15.

[11] 李敬华,温晓蕾,王长青,等.猪肉与菌糠复配对亮斑扁角水虻生长发育的影响[J].中国农业科技导报,2019,21(9):143-148.

[12] 齐乃萍,秦铭璐,李增安,等.黄粉虫对三种肉类的转化效果研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2019,50(6):950-953.