高亚硝酸盐胁迫下日本囊对虾 肝胰腺的转录组分析

陈亭君,栗志民*,袁 乐,刘建勇,梁彩凤

(广东海洋大学水产学院,广东湛江 524088)

摘 要:为研究日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus) 耐高亚硝酸盐的分子调控机制,利用新一代高通量 Illumina 测序技术,对日本囊对虾在高亚硝酸盐胁迫下的肝胰腺进行转录组测序,通过对高质量序列的拼接组装以及功能基因的注释和分类,发掘与耐高亚硝酸盐相关性状的候选基因。实验结果表明:①10个文库共获得 920 785 608个净读本,数据量为 6.48G~7.34G。②Q30>93.07%。利用 Trinity 软件组装后获得 46 308条单基因簇,N50为 1 833 bp。③与对照组相比,高亚硝酸盐组分别识别出 593、606、1 089、497 和 988 个差异表达基因。④对 DEGs 进行功能注释,得到与免疫和代谢相关的通路和基因。⑤采用 qPCR 对随机选择的 9 个差异基因(DPD、ABCH、ProPOb、ACADL、CYP2J、PAT4、BHMT、CLEC 和 PEPCK)在高亚硝酸盐胁迫下的表达情况进行检测,其表达量与转录组测序技术(RNA Sequencing,RNA-seq)趋势一致。本研究结果丰富了对虾 cDNA 数据库的信息,为日本囊对虾在高亚硝酸盐胁迫下的分子机制研究奠定了基础。

关键词:日本囊对虾;转录组;高亚硝酸盐胁迫;荧光定量 PCR(qRT-PCR);差异基因表达

中图分类号:S914.7; Q523.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-6647(2022)02-0287-20

doi:10.12362/j.issn.1671-6647.2022.02.011

引用格式:陈亭君, 栗志民, 袁乐, 等. 高亚硝酸盐胁迫下日本囊对虾肝胰腺的转录组分析[J]. 海洋科学进展, 2022, 40(2): 287-306. CHEN T J, LI Z M, YUAN L, et al. Transcriptome analysis of hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* under high nitrite stress[J]. Advances in Marine Science, 2022, 40(2): 287-306.

日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus)是全球最具有经济价值的甲壳类动物之一,广泛分布于印度-西 太平洋、日本、中国和澳大利亚等地区^[1-4],养殖规模呈逐年升高态势,其养殖方式包括集约化和半集约化养 殖^[5]。国内对该虾类的养殖方式已逐渐由室外土池养殖转变为室内高集约化养殖,以满足市场日益增长的 需求^[6-7]。要提高集约化养殖的生产效率和经济效益,水质控制格外重要^[8]。近年来,在集约化养殖中,由于 过多的投饵量和不彻底的养殖池排污,使高含氮(N)排泄物和残饵在水体中累积,超过了养殖水体中亚硝化 细菌和硝化细菌的代谢能力,使得亚硝酸盐氮的质量浓度达到了较高水平^[9-10]。

亚硝酸盐氮是氨氧化成硝酸盐的中间产物,它使氧合血蓝蛋白转化为脱氧血蓝蛋白,降低血淋巴对 氧的亲和性,降低机体的输氧能力,最终造成水产动物缺氧甚至死亡^[11-13]。大量研究已经证实亚硝酸盐 氮对多种虾类具有较强的毒性^[14-18],包括损坏器官^[19]、生长和发育变慢^[20-21]、降低存活率^[22]和免疫能 力^[23-24]等。值得一提的是,盐度下降会导致虾类对亚硝酸盐的耐受性降低^[15,25],pH下降时亚硝酸盐应激 会导致虾类氮的排泄、离子调节和气体交换被干扰,并可能导致载氧能力下降^[26]。过去的研究中,发现 亚硝酸盐胁迫对日本囊对虾的免疫和代谢均能产生影响,在亚硝酸盐胁迫下,日本囊对虾血淋巴中氧血 色素苷、蛋白质,以及氧血色素苷/蛋白质的比值减少,氮代谢和酸碱平衡发生改变,渗透压降低,尿素增

收稿日期:2021-04-27

资助项目:湛江市科技计划现代农业技术攻关项目——日本囊对虾速长新品系选育(2020A03004)

作者简介:陈亭君(1995一),女,硕士研究生,主要从事水生经济动物遗传育种方面研究. E-mail:952672877@qq.com

* 通信作者: 栗志民(1972—), 男, 教授, 博士, 主要从事水生经济动物遗传育种方面研究. E-mail: lizhimin811@163.com

(王佳实 编辑)

加^[27-29]。血淋巴亚硝酸盐和血淋巴尿素随环境亚硝酸盐和暴露时间的增加而增加^[29]。此外, Zheng 等^[30]克隆了与凋亡相关的基因 *caspase*-3 和 *DAD*-1, 初步探讨了亚硝酸盐胁迫对免疫相关基因和凋亡相关蛋白的遗传响应的分子机制。

在甲壳类生物学领域,利用转录组测序技术(RNA-seq)研究基因表达已广泛用于比较生理学、生态学、 进化、环境监测和商业化养殖中^[31]。近年来,关于亚硝酸盐胁迫下甲壳类转录组的研究仅见于凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*)^[32]和日本沼虾(*Macrobrachium nipponense*)^[33],研究显示凡纳滨对虾和日本沼虾 在亚硝酸盐胁迫下的免疫相关通路和凋亡通路非常活跃,已筛选得到许多与免疫反应、解毒、凋亡途径相关 的候选基因。然而,有关亚硝酸盐胁迫下日本囊对虾的分子机制仍然知之甚少。甲壳类动物的肝胰腺不仅 是重要的消化器官,在脂质、碳水化合物等代谢过程中起重要作用,而且是不可或缺的免疫器官,跟解毒和免 疫息息相关^[33-34]。因此,本研究通过转录组测序技术获得在高亚硝酸盐胁迫下日本囊对虾肝胰腺转录组信 息,为探讨高亚硝酸盐胁迫下的分子机制、丰富 cDNA 数据库的信息、识别免疫和凋亡等通路的差异基因提 供分子证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

由广东国联水产有限公司提供第 3 代健康的 120 日龄混合家系日本囊对虾,其平均体长(49.28±4.79) mm,平均体重(1.39±0.38)g。实验前,将日本囊对虾在水温(28±0.2)℃、盐度(29.8±0.2)、溶解氧(Dissolved Oxygen, DO)6.0 mg/L条件下于水泥池中驯化 7 d,以减轻应激反应。

通过预实验,确定高亚硝酸盐胁迫质量浓度为 80 mg/L(在此质量浓度下,胁迫 96 h 的存活率约为 80%)。实验分为对照组(CG)和高亚硝酸盐组(N)。以新鲜海水作为对照(亚硝酸盐质量浓度<0.02 mg/L)。采用分析纯(NaNO₂)溶于新鲜海水配制质量浓度为 2 000 mg/L 母液,贮藏于阴暗干燥环境备用, 实验时通过稀释母液配制高亚硝酸盐(80 mg/L)。

采用1500L塑料桶进行对照组和高亚硝酸盐组实验,其他实验条件与驯化条件一致。实验期间不投 饵,持续96h,每24h用高亚硝酸盐试纸测定1次质量浓度,以保持恒定水平。实验设置3个重复组。于6、 12、24、48和96h分别从高亚硝酸盐组(N6、N12、N24、N48和N96)和对照组(CG6、CG12、CG24、CG48和 CG96)取样,每个时间点各取9尾虾采集肝胰脏,保存于含1mLRNAhold的离心管中。样品在4℃下保存 过夜,然后在-20℃下保存,直到提取RNA。

1.2 RNA 提取及 Illumina 测序

利用 TRIzol 试剂(Invitrogen,US)从肝胰脏中提取总 RNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 降解和 污染状况。分别通过 NanoPhotometer[®]分光光度计(Implen,CA,USA)和 Qubit[®] RNA Assay Kit and Qubit[®] 2.0 荧光计(Life Technologies,CA,USA)检查 RNA 纯度和浓度。采用生物分析仪 2100 系统(Agilent Technologies,CA,USA)中的 RNA Nano 6000 检测试剂盒评估 RNA 完整性。本研究使用 Illumina[®] 的 NEBNext[®] UltraTM RNA Library Prep Kit(NEB,USA)生成,共构建了 10 个文库。首先,利用带有 Oligo (dT)的磁珠从 1 μ g 总 RNA 中富集有 poly-A 尾的 mRNA;然后,加入 Fragmentation Buffer,将 mRNA 随 机断 裂 成 200 bp 左右的小片段;第 3 步,采用 SuperScript Double-Stranded cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)试剂盒,加入六碱基随机引物(Illumina),以 mRNA 为模板反转录合成第 1 链 cDNA,进行第 2 链合成,形成稳定的双链结构;第 4 步,双链的 cDNA 结构为黏性末端,加入 End Repair Mix 将其补成平末 端,随后在 3末端加上 1 个 A 碱基,用于连接 Y 字形的接头,具体步骤参见试剂盒说明书;最后,Agencourt AMPure XP(Beckman Coulter,Brea,CA,USA)对 PCR 产物进行纯化,并在 Agilent 2100 生物分析仪系统 上对文库质量进行评估。库检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求混合(pooling) 后,使用 NovaSeq6000 仪器进行(Illumina,美国)测序。

1.3 测序数据过滤和组装

为了得到高质量的测序数据,必须将测序得到的原始测序序列(Sequenced Reads)或粗读本(Raw Reads)过滤为净读本(Clean Reads):①去掉含测序接头(Adapter)的读数;②去掉 N(N 代表无法确定碱基 信息)的比例>10%的读数;③去除低质量读数,即碱基质量(Phred score, Qphred ≤ 20 的碱基数占整个碱基 的 50%以上的读数)。同时,计算 clean reads 的 Q>20、30 的碱基,以及 G 和 C 的数量总和占总的碱基数量 的百分比(Q20、Q30 和 GC 含量)。所得到的高质量 clean reads 用于后续分析,并采用 Trinity 软件对 clean reads 进行组表^[35]。

1.4 基因差异表达分析及功能注释

首先,利用 bowtie2 软件^[36]将净读本比对到转录组序列上;然后,使用 RSEM^[37](http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/)对 bowtie2 软件的比对结果进行统计,进一步得到每个样品比对到每个基因上的 read count 数目,并对其进行(Fragments Per Kilobase Million, FPKM)转换^[38]。先使用 edgeR v.3.0.8 软件和 1 个尺度归一化因子调整每个序列库的读计数,而后采用 TMM 对 read count 数据进行标准化处理,再使用 DEGseq 对 N 组和 GC 组之间的 DEGs 进行差异分析,需 q 值(q-value)结合差异倍数(Fold Change, FC)来 筛选,q \leq 0.05 且|log₂FC(Sample2/Sample1)|(基因表达量差异倍数是以 2 为底数的对数值) \geq 1,则该基因 为显著差异表达基因^[39]。

基于非冗余蛋白质数据库(Non-Redundant Protein Sequence Database, Nr)、非冗余核苷酸数据库(Nucleotide Sequence Database, Nt)、蛋白质和真核生物的同源群(euKaryotic Ortholog Groups/Clusters of Orthologous Groups of Proteins, KOG/COG)、蛋白质家族(Protein family, Pfam)、京都基因与基因组 百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)^[40]和GO(Gene Ontology, GO)数据库^[41] 对基因功能进行注释。

1.5 荧光定量验证转录组数据

随机选择 9 个 DEGs,进行 qPCR 验证,分别是:ATP 结合盒转运蛋白(ATP-binding cassette transporters,ABC transporters)、二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase,DPD)、酚氧化酶原 b(prophenoloxidase b,proPO b)、长链脂酰辅酶 A 脱氢酶(long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase,LCAD)、细胞 色素家族(cytochrome P450,family 2,subfamily J,CYP2J)、质子偶联氨基酸转运蛋白 4(Proton-coupled Amino acid Transporter 4,PAT4)、甜菜碱同型半胱氨酸 S-甲基转移酶(betaine-homocysteine S-methyl-transferase,BHMT)、C 型凝集素(C-type lectin,CLEC)和磷酸烯醇丙酮酸羧基激酶(phosphoenolpyruvate carboxykinase,PEPCK),对上述 9 个 DEGs 进行 qPCR 验证。利用 Primer 5.0 软件设计特异性引物(表 1),送至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

qPCR使用 TransStart Tip Green SuperMix(北京全式金生物科技有限公司)试剂,以延伸因子 1α (EF1α)为参考基因,通过罗氏 LightCycler480 II 实时荧光定量 PCR 系统进行扩增。扩增在 384 孔板上进行,反应总体积为 10 μL,包括:1 μL cDNA、每个基因特异性正向和反向引物各 0.2 μL、5 μL TransStart Tip Green qPCR SuperMix 和 3.6 μL 无酶水。 qPCR 步骤为:94 ℃ 30 min;94 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 10 s(45 个循环);95 ℃ 10 s,65 ℃ 60 s,95 ℃ 1 s。相对表达量采用 2^{-ΔΔCT}法计算,数据为平均值±标准差(Means ± SD),通过 SPSS19.0 软件中的单因素方差分析(one way ANOVA)进行统计学检验,差异显著性为 P < 0.05,差异极显著为 P < 0.01。

表 1 qPCR 引物合成

Table 1Primer sequences for qPCR validation.						
引物	序列(5′-3′)	引 物	序列(5′-3′)			
ABCHF	CATCTACGCCGTGACTGACATA	PAT4F	GAAGGGTCTAGGCATGTGGA			
ABCHR	ATCAAAATTGGGTATCCGCTCT	PAT5R	TAACCCAGCACTTTCCAAGG			
DPYDF	CCAAATTAGGCCTCCACACATA	BHMTF	GAGTACTGGGAGAACCTCAGACCTT			
DPYDR	GAGCTCAAGCCCCCTACATACT	BHMTR	TTTTTGGTCTTGAGAAGCTTGATCT			
ProPObF	GGTCGTCTAGACAGGACTCCACT	CLECF	AGTGCCAGTGCCCCTCTACT			
ProPObR	ACGTAAGAACCGTTTTCATGGAT	CLECR	CTGGAGAGCGTCCTGCAT			
ACADLF	CTGCCACCATGTCTGGGATG	PEPCKF	TGTCACCTGAAGAGCTGAAGAAG			
ACADLR	AAGGACGTAAGCTGGAGAAGATG	PEPCKR	AGTCTTGTTCAGCAAGTGTGTCC			
CYP2JF	AATTCAAAAAGGATTATGGCAACAT					
CYP3JR	GTATTGAACGTGAAGATGTTGAAGG					

注:空白处无数据。

2 结 果

2.1 转录组的测序和从头组装

转录组测序后,从 CG 组和 NG 组构建的 10 个文库中共产生 961 590 184 个 raw reads,除去包含适配 器序列或 poly-N 序列的读取和原始读取中的低质量读取,共获得 920 785 608 个 clean reads。在所有的文 库里,碱基质量及组成分析显示,各样品 Q30 均≥93%,GC 含量为 50.29%~52.95%(表 2)。利用 Trinity 软件对获得的 clean reads 进行组装,去除冗余之后分别获得 74 856 条转录本(Transcripts)和 46 308 条单 基因簇(Universal Gene, Unigenes)。转录本的 N50 长度(将转录本按照长度从长到短排序,依次累加转录 本的长度,当累计转录本长度达到转录本总长的 50%时,拼接的转录本的长度为 N50,可用于评估拼接效 果)和 N90 的长度分别为 2 408 和 470 bp, unigenes 的 N50 和 N90 的长度分别为 1 833 和 435 bp。对组装 出来的 unigenes 进行长度分布统计,其最小长度为 301 bp,分布在 300~500 bp 的有 18 954 条,占总数的 40.93%,数量最多;大于 2 000 bp 只有 6 323 条,只占总数的 13.65%,平均长度为 1 300 bp(表 3 和表 4)。将 Trinity 软件拼接得到的转录本序列,作为后续分析的参考序列。

	Tuble 2 Summary of Sample Sequencing and quality								
样 本	raw reads/个	clean reads/ \uparrow	净据/G	错误率/%	$\mathbf{Q}20/\frac{9}{0}$	Q 30/%	GC/%		
CG6	95 787 748	91 109 572	6.83	0.02	98.11	94.53	51.82		
CG12	96 161 432	92 512 196	6.94	0.03	97.87	93.97	51.43		
CG24	93 332 104	89 650 404	6.72	0.02	98.05	94.38	51.84		
CG48	95 880 860	91 441 792	6.86	0.02	98.1	94.5	51.12		
CG96	92 941 212	88 924 092	6.67	0.02	98.01	94.29	50.29		
N6	104 200 656	97 918 092	7.34	0.03	97.67	93.44	52.21		
N12	95 827 780	93 386 896	7.00	0.03	97.56	93.2	52.95		
N24	95 217 992	92 696 684	6.95	0.03	97.52	93.07	51.11		
N48	91 905 620	86 424 960	6.48	0.03	97.86	93.89	51.44		
N96	100 334 780	96 720 920	7.25	0.03	97.57	93.22	50.74		

表 2 样本测序数据质量汇总

Table 2 Summary of sample sequencing data quality

÷	表 3 拼接长度分布		表 4 长度频数分布 Table 4 Length frequency distribution				
Table 3	Splicing length dist	ribution					
拼接长度/bp	transcripts	unigenes	拼接频数/条	transcripts	unigenes		
最小长度	301	301	300~500 bp	28 686	18 954		
平均长度	1 300	1 098	500~1 000 bp	19 892	14 119		
中间长度	634	577	$1\ 000 \sim 2\ 000\ bp$	12 350	6 912		
最大长度	99 700	99 700	1000 - 000 SF	12 000			
N50	2 408	1 833	>2 000 bp	13 928	6 323		
N90	470	435	总数	74 856	46 308		

采用单拷贝直向同源数据库 BUSCO 对拼接得到的 unigenes 进行拼接质量评估,结果显示:有 978 个 BUSCO 被完全覆盖,完全匹配到的单拷贝(Complete and Single-Copy)的 unigenes 为 902 条,占总数的 92.2%;多拷贝(Complete and Duplicated)、部分片段匹配(Fragmented)和没有匹配(Missing)的 unigenes 分别为 28、26 和 22 条,分别占总数的 2.9%、2.7%和 2.2%(表 5)。

表 5	拼接转录本	BUSCO	评估
-----	-------	--------------	----

Table 5 Busco evaluation of splicing transcripts

类型	单拷贝		多拷贝		部分片段匹配		没有匹配	
	个数/条	占总数比例/%	个数/条	占总数比例/%	个数/条	占总数比例/%	个数/条	占总数比例/%
cluster	902	92.2	28	2.9	26	2.7	22	2.2
unigene	902	92.2	28	2.9	26	2.7	22	2.2
trinity	619	63.3	312	31.9	27	2.8	20	2.0

注:cluster代表富集簇。

2.2 基因的功能注释

將拼接得到的 48 807 条 unigenes 通过 NR、NT、Swiss-Prot、PFAM、KO、KOG 和 GO 七大数据库进行 基因功能注释,注释到的 unigenes 数量(比例)分别为: 25 833(55.78%)、21 342(46.08%)、22 628 (48.86%)、25 015(54.01%)、3 615(7.8%)、9 474(20.45%)和 25 015(54.01%)条。在 7 个数据库中至少注 释到 1 个数据库的 unigenes 数量为 34 361 条,占总数的 74.2%,而在 7 个数据库都注释到的 unigenes 数量 为 1 501 条,占 unigenes 总数的 3.24%(表 6)。其中,比对到 NR 数据库的数据根据物种来源来分析,注释到 前 3 位的物种分别是美洲钩虾(Hyalella azteca),日本囊对虾(Marsupenaeus japonicus)和凡纳滨对虾 (Litopenaeus vannamei),匹配 unigenes 数量分别占总数的 31.6%、14.4%和 6.6%(图 1)。

将全部 unigenes 进行 GO 数据库比对,结果显示:一共有 25 015 条 unigenes 被成功注释和分类到生物 过程(Biological Process)(25 个亚类)、细胞组分(Cellular Component)(20 个亚类)和分子功能(Molecular Function)(10 个亚类)三大类中。在生物过程中,参与细胞过程(GO: 0009987)、代谢过程(GO: 0008152)、 单细胞组织过程(GO: 0044699)最多,分别注释到 14 335(57.31%)、13 080(52.29%)和 12 325(49.27%)条 unigenes;在细胞组分中,主要与细胞组分(GO: 0044464)、细胞(GO: 0005623)和膜(GO: 0016020)有关, 分别注释到 6 724(26.88%)、6 724(26.88%)和5 159(20.62%)条 unigenes;在分子功能中,主要与结合功能

和催化活性有关,分别注释到 11 937(47.72%)和 11 516(46.04%)条 unigenes(图 2)。

表	6	基	ᄎ	注	释	成	功	率	统	ì	ŀ
~	v		-		ч т	~~~	-//	-	-)6		

Table 6 Statistics of success rate of gene annotation

数据库	注释成功的 unigenes/条	占总 unigenes 的比例/%
NR	25 833	55.78
NT	21 342	46.08
SwissProt	22 628	48.86
PFAM	25 015	54.01
КО	3 615	7.80
KOG	9 474	20.45
GO	25 015	54.01
全部数据库均有注释	1 501	3.24
至少一个数据库有注释	34 361	74.20
总数	46 308	100.00





Fig.1 Comparable species distribution in the NR database

将 unigenes 与 KOG 数据库进行比对,结果显示,9 474 条 unigenes 被成功注释并按 26 个 KOG 进行分类:①注释到一般功能预测(General Function Prediction Only)的 unigenes 最多,为 1 364 条,占总数的 14.40%;②翻译后修饰、蛋白质转化和分子伴侣(Posttranslational Modification, Protein Turnover, Chaperones)、信号转导机制(Signal Transduction Mechanisms)、氨基酸运输和代谢(Amino Acid Transport and



Fig.2 Classification statistics of GO annotation classification statistics

Metabolism)及翻译、核糖体结构与生物发生(Translation, Ribosomal Structure and Biogenesis)注释到的 unigenes 分别有 957(10.10%)、882(9.31%)、801(8.45%)和 718(7.58%)条;③未知蛋白(Unamed Protein) 注释到的 unigenes 最少,仅占总数的 0.02%(图 3)。



对 3 615 条 unigenes 进行 KO 成功注释后,根据 unigenes 参与的 KEGG 代谢通路进行分析,将其分为 细胞过程(A)、环境信息处理(B)、遗传信息处理(C)、代谢(D)和有机系统(E)五个分支,分别占总 unigenes 的 13.67%、12.72%、16.74%、53.72%和 23.82%。代谢通路的过程很多,其中富集的前 3 条通路分别为碳水 化合物代谢(Carbohydrate Metabolism)、信号转导(Signal Transduction)和氨基酸代谢(Amino Acid



Metabolism),富集的 unigenes 数量分别为 364(10.07%)、362(10.01%)和 332(9.18%)条。另外,信号转导 (Signal Transduction)和免疫系统(Immune System)通路也被显著富集(图 4)。

Fig.4 Classification statistics of KEGG metabolic pathway

2.3 差异基因表达分析

针对日本囊对虾在 5 组不同处理时间进行了 N 组和 CG 组两两比较分析,识别出亚硝酸盐胁迫下发生 变化的基因,并绘制火山图(图 5)。结果显示,日本囊对虾在亚硝酸盐协迫下 N 组与 CG 组两两相比共筛选 出3 733个差异表达基因(Differentially Expressed Genes, DEGs);与对照组相比,N6、N12、N24、N48 和 N96 组分别识别出 593、606、1 089、497 和 988 个 DEGs(表 7),其中差异基因数量最多的为 N24(1 089 个),最少 的为 N48(497 个)。总的来说,下调的 DEGs 数量(1 943 个)比上调的 DEGs 数量(1 830 个)多,在 N12、N48 和 N96 组,下调的 DEGs 比上调的多,而在 N6 和 N24 组则相反。

将 N6 vs CG6、N12 vs CG12、N24 vs CG24、N48 vs CG48 和 N96 vs CG96 各组的 DEGs 数量进行统计, 绘成韦恩图(Venn Diagram),找到在亚硝酸盐胁迫下 5 组不同处理时间的 19 个共同 DEGs(图 6)。把 DEGs 分别与 NR、NT、KOG/COG、PFAM、Swiss-Prot、KEGG 和 GO 七个数据库进行比对和功能注释,至 少注释到 1 个数据库的概率分别为 89.88%、89.93%、90.36%、89.54% 和 90.49%(表 7)。19 条共同的 DEGs 注释和上下调情况如表 8,结果显示有 8 个假定蛋白基因(Hypothetical Protein),其他的多为免疫基 因,如 ATP 结合盒转动体(ATP-binding cassette transporter)、C 型凝集素(C-type lectin)、磷酸烯醇丙酮 酸羧激酶醇(phosphoenolpyruvate carboxykinase)、磷脂氢过氧化物(phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase)、谷胱甘肽过氧化物酶(prophenoloxidase b)和预测:细胞色素 P450 9e2 亚型 X1(cytochrome P450 9e2 isoform X)等。



注:log2FC代表基因在不同实验组中表达倍数变化;-lg(padj)代表基因表达量变化的统计学显著程度;

q 值越小, $-\lg q$ 越大,则差异越显著, 左边为亚硝酸盐胁迫组(N组), 右边为对照组(CG组)。

图 5 差异基因的火山图

Fig.5 Volcano map of differential genes

表 7 DEGS 的数目及注释率

Table 7 Quantity and annotation rate of DEGs

分组项目	DEGs 数目/个	上调/个	下调/个	注释成功的 DEGs 数目/个	比例/%
N6 vs CG6	593	303	290	533	89.88
N12 vs CG12	606	235	371	545	89.93
N24 vs CG24	1 089	615	474	984	90.36
N48 vs CG48	497	187	310	445	89.54
N96 vs CG96	988	490	498	894	90.49



注:图中圈内所有数字之和代表比较组合差异基因总数;重叠区域表示组合间共有的差异基因个数。 图 6 差异基因韦恩图

Fig.6 Venn diagram of DEGs

表 8 不同胁迫时间下共同差异基因筛选情况

Table 8 Screening of common differential genes under different stress times

差异基因 NR 数据库描述	N6 vs CG6	N12 vs CG12	N24 vs CG24	N48 vs CG48	N96 vs CG96
假定蛋白 BRAFLDRAFT_206907	上调	上调	下调	上调	下调
假定蛋白 BRAFLDRAFT_78594	下调	下调	下调	下调	上调
假定蛋白 DAPPUDRAFT_207173	下调	下调	上调	下调	下调
假定蛋白 DAPPUDRAFT_302851	下调	上调	下调	上调	下调
假定蛋白 DAPPUDRAFT_31637, partial	上调	下调	上调	上调	上调
假定蛋白 DAPPUDRAFT_328375	上调	下调	下调	下调	下调
假定蛋白 LOTGIDRAFT_233044	下调	上调	下调	上调	上调
假定蛋白 LOTGIDRAFT_233044	下调	上调	下调	上调	下调
ATP 结合盒转运体	下调	下调	上调	下调	上调
C型凝集素	上调	上调	上调	下调	上调
磷酸烯醇丙酮酸羧激酶	下调	下调	上调	下调	下调
磷脂氢过氧化物 谷胱甘肽过氧化物酶	上调	下调	上调	下调	下调
预测:细胞色素 P450 9e2 亚型 X1	上调	上调	上调	上调	上调
预测:类似二氢嘧啶脱氢酶[NADP(+)]	下调	上调	上调	上调	上调
预测:长链特异性酰基辅酶 a 脱氢酶,类线粒体	下调	下调	下调	下调	下调
酚氧化酶原 b	下调	上调	上调	上调	上调
前列腺素还原酶 1	下调	下调	下调	下调	下调
质子耦联氨基酸转运体 4	上调	下调	上调	下调	下调
原名:完全=细胞色素 P4502L1	上调	上调	上调	上调	上调

2.4 差异基因的 GO 功能分类和 KEGG 富集分析

对 N6 vs CG6、N12 vs CG12、N24 vs CG24、N48 vs CG48 和 N96 vs CG96 五组比较所得的 DEGs 分别 进行 GO 富集分析,共富集到 1 758~2 399 个 GO terms type。DEGs 富集到生物过程中的数量最多,占总 数的 58.76%~61.06%,分子功能次之(表 9)。对 5 组显著富集(P<0.05)的 GO 相关的上调基因(红色)和 下调基因(蓝色)的分类统计做成柱状图(图7),由图7可见,N24 vs CG24组 DEGs 显著富集到生物过程、



(a)N6 vc CG6



(b)N12 vs CG12





图 7 差异基因的 GO 富集分析图

Fig.7 Go enrichment analysis of differential genes

细胞组分和分子功能,其他组富集到生物过程和分子功能;在生物过程中,几丁质代谢过程、含氨基葡萄糖的 复合代谢过程和氨基糖代谢过程富集到所有组中;另外,氧化还原过程在 N6 vs CG6、N12 vs CG12 和 N48 vs CG48 组中显著富集且富集到 DEGs 最多;在分子功能中,氧化还原酶活性、铁离子结合、血红素结合和几 丁质结合富集于所有组中;在N24 vs CG24 中富集到最多 DEGs 的 3 个细胞组分是细胞外区、线粒体和线粒体部分。

Table 9GO enrichment analysis of differential genes								
DEG 组	GO terms 类型/个	生物过程 数量/个	生物过程 比率/%	细胞组分 数量/个	细胞组分 比率/%	分子功能 数量/个	分子功能 比率/%	
N6 vs CG6	1 773	1 044	58.88	261	14.72	468	26.40	
N12 vs CG12	1 816	1 075	59.20	240	13.22	501	27.59	
N24 vs CG24	2 399	1 438	59.94	339	14.13	622	25.93	
N48 vs CG48	1 758	1 033	58.76	265	15.07	460	26.17	
N96 vs CG48	2 386	1 457	61.06	313	13.12	616	25.82	

表 9 差异基因 GO 富集分析

对 N6 vs CG6、N12 vs CG12、N24 vs CG24、N48 vs CG48 和 N96 vs CG96 的 DEGs 数量分别进行 KEGG 通路富集分析,结果显示,分别有 82、100、174、73 和 166 个通路发生激活或抑制。对每组的前 20 个 (top20)通路富集做散点图(图 8)。如图 8 所示,发生显著富集的 KEGG 通路有溶酶体(ko04142)、TGF-β 信号通路(ko04350)、AMPK 信号通路(ko04152)、PI3K-Akt 信号通路(ko04151)、p53 信号通路(ko04115)、 过氧化物酶体(ko04146)、吞噬体(ko04145)、细胞凋亡(ko04210)、PPAR 信号通路(ko03320)、胆碱代谢(ko05231)、亚油酸代谢(ko00591)、精氨酸和脯氨酸代谢(ko00330)等。





Fig.8 Enrichment scatter plot of differential genes in KEGG pathway

2.5 qPCR 验证 RNA-seq

采用 qPCR 检测在高亚硝酸盐胁迫下 9 个差异基因(DPD、ABCH、ProPOb、ACADL、CYP2J、 PAT4、BHMT、CLEC 和 PEPCK)的表达情况。qPCR 结果显示,基因在不同时间的高亚酸盐胁迫下,呈 现显著上调或下调(P<0.05 或 P<0.01),且与 RNA-seq 趋势一致。这一结果进一步验证了 RNA-seq 的 可靠性和准确性(图 9)。

3 讨 论

日本囊对虾集约化的养殖模式容易引起亚硝酸盐的积累,从而影响该虾类的健康养殖^[14]。为了在分子 水平上更好地了解虾类对亚硝酸盐胁迫反应,采用转录组测序研究高亚硝酸盐胁迫下日本囊对虾调控机制 和差异基因表达。研究利用 Illumina 测序平台,获得了不同时间(6、12、24、48 和 96 h)高亚硝酸盐胁迫下日 本囊对虾肝胰腺的转录组数据。通过 Trinity 软件对获得的净读本进行组装,去除冗余之后获得 46 308 条 unigenes,N50 和 N90 分别为1 833 bp 和 435 bp,平均长度为1 098 bp。墨吉明对虾(*Fenneropenaeus mer*-



Fig.9 Comparison of 9 DEGs by qRT-PCR and transcriptome

guiensis)的转录组获得 41 877 条 unigenes, N50 为 1 533 bp^[42]。凡纳滨对虾的转录组获得 52 073 条 unigenes, 平均长度为 520 bp, N50 为 745 bp^[43]。日本囊对虾组装的 unigenes 数量比凡纳滨对虾少, 而比墨吉 明对虾多, 但组装长度大于凡纳滨对虾和墨吉明对虾。采用 BUSCO 对拼接得到的 unigenes 进行质量评 估, 结果显示有 978 个 BUSCO 被完全覆盖, 完全匹配到的 unigenes 为 902 条, 占总数的 95.1%, 部分片段匹 配和没有匹配的 unigenes 分别占总数的 2.7% 和 2.2%。因此, 认为该转录组具有高质量的组装拼接数据。

甲壳类动物缺乏适应性免疫系统,而完全依赖于先天免疫系统抵制入侵的病原体或响应环境胁迫^[4+45]。 甲壳类动物免疫学研究主要集中在识别感染过程中激活的防御机制和生化途径,如凝集素、酚氧化酶原系统 (proPO)、吞噬和包围等^[46-47]。例如,中国对虾被 WSSV 感染后,吞噬体、补体和凝血级联反应等与免疫应答有 关的通路以及免疫基因可被激活^[48]。本研究对差异基因进行 KEGG 注释,发现吞噬体(ko04145)通路在 6、24 和 48 h 时被富集,且该通路的差异基因显著上调,这表明在高亚硝酸盐胁迫下通过激活吞噬体通路来参与免疫 调节应答,这与中国对虾相似。另外,还发现大量与免疫相关其他的通路,如溶酶体(ko04142)、TGF-β 信号通 路(ko04350)、PI3K-Akt 信号通路(ko04151)、p53 信号通路(ko04115)、吞噬体(ko04145)、细胞凋亡(ko04210)、 PPAR 信号通路(ko03320)等。Guo 等^[32]研究了高亚硝酸盐胁迫凡纳滨对虾的转录组同样发现了凋亡信号通 路、p53 信号通路、PPAR 信号通路、MAPK 信号通路以及吞噬作用通路,这与本研究一致。而溶酶体 (ko04142)、TGF-β 信号通路(ko04350)在亚硝酸盐胁迫日本沼虾的转录组中也被富集到^[33]。这些研究结果表 明,亚硝酸盐胁迫下,对虾的这些免疫通路起着至关重要的作用,具体的机制还有待进一步研究。

根据差异基因韦恩图以及注释结果,我们选择了9个 DEGs 进行 gPCR 分析,结果显示高亚硝酸盐胁迫后, 这些参与免疫应答的基因表达水平均发生显著变化。Wei等[49]和 Wang 等[50]研究表明,C型凝集素在先天性 免疫中起着重要的作用,能有效识别和消灭病原体。当细菌感染凡纳滨对虾^[48]和中国对虾^[50]时,C型凝集素 基因的表达水平会升高。在本研究中,C型凝集素基因的表达水平呈现上升-下降-上升的趋势,在早期(6~24 h)显著上调,到48h时受到抑制,而96h时又显著上调。墨吉明对虾的C型凝集素基因表达量在感染弧菌后 的早期(12 h前)显著上升,而在 24 和 48 h时下降[51],与本研究类似。因此,C型凝集素基因在对虾环境胁迫下 起着重要的调节作用。甲壳类动物的酚氧化酶原(proPO)系统在非自我识别与宿主免疫反应中起重要作 用^[52-54]。Prophenoloxidase b 有助于甲壳类动物血浆的黑色素化,为先天免疫系统的一个主要组成部分^[55]。在 本研究中发现, Prophenoloxidase b 的表达水平在亚硝酸盐胁迫下早期显著下调, 12 h 之后显著上调, 推测酚氧 化酶原 b(ProPO b)基因主要通过促进表达来参与免疫应答。同时,在共同差异基因中还发现了与免疫相关的 磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase, PHGPx)和细胞色素 P450 (cytochrome P450)异构体基因。谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GPx)在脂质和过氧化氢的解 毒过程中起重要作用,脂质和过氧化氢在吞噬或生理代谢过程中,随着谷胱甘肽的氧化而迅速形成[56]。 PHGPx 是谷胱甘肽过氧化酶(GPx)家族中的一种抗氧化酶,它能降低磷脂的过氧化氢,维持生物膜的完整 性[57]。已有研究表明,在LPS应激下,拟穴青蟹(Scylla paramamosain)肝胰腺中的 PHGPx 表达水平分别在 6 和 12 h 显著上调,之后表达量逐渐下调至正常水平[58]。在本研究中发现 PHGPx 在亚硝酸盐胁迫下表达量 呈现上调和下调交替的现象,与拟穴青蟹中 PHGPx 的表达情况类似,推测 PHGPx 在日本囊对虾的免疫调节 中起着重要作用。细胞色素 P450(Cytochrome P450)是一种重要的解毒酶,在甲壳类动物体内外源性和内源性 化合物的生物转化中起着重要作用^[59-60]。在共同差异基因中发现一个细胞色素 P450 的异构体基因,该基因的 表达水平在高亚硝酸盐胁迫 6~96 h内显著上升。在凡纳滨对虾转录组中同样发现了很多与 P450 相关的基 因,这些发现为深入研究无脊椎动物的解毒反应提供了丰富的信息[31]。因此,推测这些免疫基因可能参与了亚 硝酸盐胁迫的免疫应答,具体功能仍需要进一步研究。

参考文献(References):

[1] TSOI K H, WANG Z Y, CHU K H. Genetic divergence between two morphologically similar varieties of the kuruma shrimp Penaeus

japonicus[J]. Marine Biology, 2005, 147(2): 367-379.

- [2] YUAN J B, ZHANG X J, LIU C Z, et al. Genomic resources and comparative analyses of two economical penaeid shrimp species, Marsupenaeus japonicus and Penaeus monodon[J]. Marine Genomics, 2018, 39: 22-25.
- [3] MAEDA M, SHIBATA A, BISWAS G, et al. Isolation of lactic acid bacteria from kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) intestine and assessment of immunomodulatory Role of a selected strain as probiotic[J]. Marine Biotechnology, 2014, 16(2): 181-192.
- [4] 袁瑞鹏,郑静静,刘建勇,等. 日本囊对虾的遗传育种研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(1): 98-104. YUAN R P, ZHENG J J, LIU J Y, et al. Reviews in genetics and breeding of *Marsupenaeus Japonicus*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2016, 36 (1): 98-104.
- [5] ROMANO N, ZENG C S. Toxic effects of ammonia, nitrite, and nitrate to decapod crustaceans: a review on factors influencing their toxicity, physiological consequences, and coping mechanisms[J]. Reviews in Fisheries Science, 2013, 21(1): 1-21.
- [6] LI Y Q, JIANG L X, WANG R J. Layered farming for Marsupenaeus japonicus Bate[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2014, 32(3): 549-553.
- [7] 林琼武,单保党,刘立东,等.北方地区秋季日本对虾室内高密度精养的试验[J].台湾海峡,2001,20(4):510-514. LIN Q W, SHAN B D, LIU L D, et al. Studies on high density culture of *Penaeus japonicus* in shrimp hatchery in autumn in North China[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2001, 20(4): 510-514.
- [8] AVNIMELECH Y, RITVO G. Shrimp and fish pond soils: processes and management[J]. Aquaculture, 2003, 220(1): 549-567.
- [9] 李玲, 楚国生. 封闭循环养殖系统氨氮和亚硝酸盐去除效果研究[J]. 吉林水利, 2010(2): 34-38. LI L, CHU G S. A study on removal ammonia, nitrogen and nitrite in close-cycle aquaculture system[J]. Jilin Water Resources, 2010(2): 34-38.
- [10] HARGREAVES J A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds[J]. Aquaculture, 1998, 166: 181-212.
- [11] JENSEN F B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2003, 135(1): 9-24.
- [12] LEWIS W M, MORRIS D P. Toxicity of nitrite to fish: a review[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2011, 115(2): 183-195.
- [13] CHENG S Y, CHEN J C. Hemocyanin oxygen affinity, and the fractionation of oxyhemocyanin and deoxyhemocyanin for *Penaeus monodon* exposed to elevated nitrite[J]. Aquatic Toxicology, 1999, 45(1): 35-46.
- [14] CHENG S Y, LEE W C, SHIEH L W, et al. Increased production and excretion of urea in the kuruma shrimp (Marsupenaeus japonicus) exposed to combined environments of increased ammonia and nitrite[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2004, 47(3): 352-362.
- [15] LIN Y C, CHEN J C. Acute toxicity of nitrite on Litopenaeus vannamei (Boone) juveniles at different salinity levels[J]. Aquaculture, 2003, 224(1/4): 193-201.
- [16] CHEN J C, LIU P C, LEI S C. Toxicities of ammonia and nitrite to Penaeus monodon adolescents[J]. Aquaculture, 1990, 89(2): 27-137.
- [17] CHEN J C, TING Y Y, LIN J N, et al. Lethal effects of ammonia and nitrite on *Penaeus chinensis* juveniles[J]. Marine Biology, 1990, 107(3): 427-431.
- [18] MALLASEN M, VALENTI W C. Effect of nitrite on larval development of giant river prawn Macrobrachium rosenbergii [J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1292-1298.
- [19] DUAN Y F, LIU Q S, WANG Y, et al. Impairment of the intestine barrier function in *Litopenaeus vannamei* exposed to ammonia and nitrite stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 279-288.
- [20] CHEN J C, CHEN S F. Effects of nitrite on growth and molting of *Penaeus monodon* juveniles[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1992, 101(3): 453-458.
- [21] HAN S, WANG B, WANG M, et al. Effects of ammonia and nitrite accumulation on the survival and growth performance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Invertebrate Survival Journal, 2017, 14(1): 221-232.
- [22] CHEN J C, LEI S C. Toxicity of ammonia and nitrite to *Penueus monodon* juveniles[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1990, 21(4): 300-306.
- [23] WANG W N, WANG A L, ZHANG Y J, et al. Effects of nitrite on lethal and immune response of Macrobrachium nipponense [J]. Aquaculture, 2004, 232(1/4): 679-686.
- [24] CHEN J C, CHENG S Y. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaeus monodon* exposed to ambient nitrite[J]. Journal of Comparative Physiology B, 1995, 164(7): 530-535.
- [25] JAVIER R R, MARTIN G F E, JUAN F F S, et al. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water[J]. Aquaculture Research, 2017, 48(5): 2337-2343.

- [26] CHEN J C, LEE Y. Effects of nitrite exposure on acid-base balance, respiratory protein, and ion concentrations of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* at low pH[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1997, 33(3): 290-297.
- [27] CHEN J C, CHENG S Y. Changes of oxyhemocyanin and protein levels in the hemolymph of *Penaeus japonicus* exposed to ambient nitrite[J]. Aquatic Toxicology, 1995, 33(3/4): 215-226.
- [28] CHENG S Y, CHEN J C. Effects of nitrite exposure on the hemolymph electrolyte, respiratory protein and free amino acid levels and water content of *Penaeus japonicus*[J]. Aquatic Toxicology, 1998, 44(1/2): 129-139.
- [29] CHENG S Y, CHEN J C. The time-course change of nitrogenous excretion in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure[J]. Aquatic Toxicology, 2001, 51(4): 443-454.
- [30] ZHENG J B, MAO Y, SU Y Q, et al. Effects of nitrite stress on mRNA expression of antioxidant enzymes, immune-related genes and apoptosis-related proteins in *Marsupenaeus japonicus*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2016, 58: 239-252.
- [31] DAS S, SHYAMAL S, DURICA D S. Analysis of annotation and differential expression methods used in RNA-seq studies in crustacean systems[J]. Integrative and Comparative Biology, 2016, 56(6): 1067-1079.
- [32] GUO H, YE C X, WANG A L, et al. Transcriptome analysis of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to nitrite by RNA-seq[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(6): 2008-2016.
- [33] YU J L, JI X S, WANG X P, et al. Identification and characterization of differentially expressed genes in hepatopancreas of oriental river prawn Macrobrachium nipponense under nitrite stress[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 87: 144-154.
- [34] JIANG H, CAI Y M, CHEN L Q, et al. Functional annotation and analysis of expressed sequence tags from the hepatopancreas of mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Marine Biotechnology, 2009, 11(3): 317-326.
- [35] GRABHERR M, HASS 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.
- [36] LANGMEAD B, TRAPNELL C, POP M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome[J]. Genome Biology, 2009, 10(3): 779-785.
- [37] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 323-323.
- [38] TRAPNELL C, WILLIAMAS 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.
- [39] WANG L, FENG Z, WANG X, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 136-138.
- [40] 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.
- [41] YOUNG M D, WAKEFILD M J, SMYTH G K, et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias[J]. Genome Biology, 2010, 11(2): 1-12.
- [42] SAETAN U, SANGKET U, DEAHAMAG P, et al. Ovarian transcriptome analysis of vitellogenic and non-vitellogenic female banana shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*)[J]. PloS One, 2016, 11(10): 1-13
- [43] XUE S, LIU Y, ZHANG Y, et al. Sequencing and de novo analysis of the hemocytes transcriptome in *Litopenaeus vannamei* response to white spot syndrome virus infection[J]. PloS One, 2013, 8(10): e0164724.
- [44] LEE S Y, SODERHALL K. Early events in crustacean innate immunity[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(5): 421-437.
- [45] MOULLAC G L, HAFFNER P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea[J]. Aquaculture, 2000, 191(1): 121-131.
- [46] VAZQUEZ L, ALPUCHE J, MALDONADO G, et al. Review: immunity mechanisms in crustaceans[J]. Innate Immunity, 2009, 15(3): 179-188.
- [47] JOHANSSON M W, SODERHALL K. Cellular immunity in crustaceans and the proPO system[J]. Parasitology Today, 1989, 5(6): 171-176.
- [48] SHI X, MENG X, KONG J, et al. Transcriptome analysis of 'Huanghai No. 2' Fenneropenaeus chinensis response to WSSV using RNA-seq[J]. Fish Shellfish Immunology, 2018, 75: 132-138.
- [49] WEI X, LIU X, YANG J, et al. Two C-type lectins from shrimp *Litopenaeus vannamei* that might be involved in immune response against bacteria and virus[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2012, 32(1): 132-140.
- [50] WANG X, XU W, ZHANG X, et al. A C-type lectin is involved in the innate immune response of Chinese white shrimp[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(4): 556-562.
- [51] RATTANAPOM O, UTARABHAND P. Molecular cloning of a C-type lectin with two CRD domains from the banana shrimp Fenneropenaeus

merguiensis: early gene up-regulation after Vibrio harveyi infection[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 106(2): 196-204.

- [52] SODERHALL K, CERENIUS L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity[J]. Current Opinion in Immunology, 1998, 10(1): 23-28.
- [53] LAI C, CHENG W, KUO C. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2005, 18(5): 417-430.
- [54] SRITUNYALUCKSANA K, CERENIUS L, SODERHALL K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. Developmental and Comparative Immunology, 1999, 23(3): 179-186.
- [55] MASUDA T, OTOMO R, KUYAMA U H, et al. A novel type of prophenoloxidase from the kuruma prawn Marsupenaeus japonicus contributes to the melanization of plasma in crustaceans[J]. Fish & Shellfish Immunol, 2012, 32(1): 61-68.
- [56] LIU C H, TSENG M C, CHENG W. Identification and cloning of the antioxidant enzyme, glutathione peroxidase, of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and its expression following *Vibrio alginolyticus* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 23(1): 34-45.
- [57] NAIR P M G, SUN Y P, CHOI J. Characterization and expression analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase cDNA from *Chironomus riparius* on exposure to cadmium[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2012, 163(1): 37-42.
- [58] 刘春云,傅明骏,张子平,等. 拟穴青蟹 PHGPx 基因的克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 161-173. LIU C Y, FU M J, ZHANG Z P, et al. Molecular cloning and expression analysis of Sp-PHGPx in Scylla paramamosain[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 161-173.
- [59] JAMES M O, BOYLE S M. Cytochromes P450 in crustacea¹[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 1998, 121: 157-172.
- [60] SNYDER M J. Cytochrome P450 enzymes in aquatic invertebrates: recent advances and future directions[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 48(4): 529-547.

Transcriptome Analysis of Hepatopancreas of Marsupenaeus japonicus Under High Nitrite Stress

CHEN Ting-jun, LI Zhi-min, YUAN Le, LIU Jian-yong, LIANG Cai-feng (College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: In order to study the molecular regulatory mechanism of *Marsupenaeus japonicus* under high nitrite stress the hepatopancreas of *M. japonicus* from both the high nitrite stress groups and the control groups were sequenced. The transcriptome of hepatopancreas of *Marsupenaeus japonicus* was analyzed by the new generation of high-throughput sequencing technique of Illumina, and the functional genes associated with high nitrite tolerance of *Marsupenaeus japonicas* was explored through the assembly of high quality sequences, gene annotation and classification. The results were as follows: a total of 920 785 608 clean reads were obtained from 10 libraries with the data volume $6.48G \sim 7.34G$ and Q30 more than 93.07%. 46 308 unigenes and 1 833 bp N50 were obtained by Trinity software. Compared with the control group, 593, 606, 1 089, 497 and 988 DEGs were obtained and DEGs were annotated to speculate the pathways and genes related to immunity and metabolism. The expression of nine differential genes speculate(*DPD*, *ABCH*, *ProPOb*, *ACADL*, *CYP2J*, *PAT* 4, *BHMT*, *CLEC* and *PEPCK*) was detected by qPCR, and the expression level was consistent with the trend of RNA-seq. This study enriched the prawn cDNA database information of prawn, and laid a foundation for the molecular mechanism of *Marsupenaeus japonicus* under high nitrite stress.

Key words: Marsupenaeus japonicus; transcriptome; high nitrite stress; quantitative real-time PCR (qRT-PCR); differential gene expression

Received: April 27, 2021