



## 急性盐度胁迫对日本黄姑鱼肌肉组织转录组的影响

孟 玮, 徐开达, 李振华, 史会来, 周永东\*

(浙江省海洋水产研究所, 浙江省海洋渔业资源可持续利用技术研究重点实验室,  
农业农村部重点渔场渔业资源科学观测实验站, 浙江 舟山 316021)

**摘要:** 盐度是影响鱼类各种生理活动的重要环境因素, 为探讨急性盐度胁迫对经济海水鱼类日本黄姑鱼基因表达水平的影响, 实验基于 Illumina HiSeq™ 2500 高通量测序平台, 对不同盐度条件下日本黄姑鱼幼鱼肌肉组织进行转录组测序并开展生物信息学分析。结果显示, 高盐组、低盐组和对照组分别获得 46 379 598、36 130 844 和 38 715 820 条 Clean reads, 总碱基数分别为 5.27、4.87 和 5.53 GB。经组装得到 91 667 条转录本, 去冗余后拼接得到 61 601 条 Unigenes。与对照组相比, 高盐组和低盐组分别有 2 230 和 1 377 个差异 Unigene 上调, 1 959 和 2 447 个差异 Unigene 下调, 随机选取 6 条差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证, 结果与转录组测序一致。通过对显著差异表达基因进行筛选, 在高盐组和低盐组中分别发现 21 和 41 个差异表达基因与离子通道相关, 共有的离子通道相关基因为 15 个, 其中 14 个基因表达趋势一致。而在高盐组和低盐组发现的离子转运体基因分别为 6 和 10 个。GO 功能富集分析发现, 差异基因显著富集在蛋白酶体、补体激活方面, KEGG 通路富集分析发现, 差异基因富集在绑定、催化活性、信号传导和分解代谢等方面。研究表明, 日本黄姑鱼对急性盐度胁迫的适应可能是一个涉及多组织和多基因的复杂过程, 盐度变化能够影响肌肉组织的离子通道、离子转运体, 蛋白降解和免疫系统功能。研究结果为今后深入开展日本黄姑鱼盐度适应的调控机制及养殖育种研究提供了参考。

**关键词:** 日本黄姑鱼; 急性盐度胁迫; 肌肉; 转录组测序; 离子通道; 离子转运体

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

盐度是影响鱼类分布、生长发育、免疫代谢以及行为活动的重要环境因子之一, 鱼类对不同盐度的适应能力是对环境变化长期选择性进化的结果, 也是遗传信息特异性表达的具体表现<sup>[1-3]</sup>。盐度的骤变会引发鱼体内外渗透压的动态调节, 使其摄食、呼吸代谢、酶和激素水平产生相应变化, 造成内环境紊乱和生理生化指标的异常<sup>[1, 4-5]</sup>。采用转录组测序 (RNA-seq) 技

术能够检测环境胁迫下关键基因表达水平的变化趋势, 从整体水平研究基因功能结构并探究生物代谢途径的调控规律<sup>[6]</sup>。利用该技术解析生物对环境适应的分子机制, 已成为生态学、进化遗传学和环境科学等多学科关注的热点<sup>[7-9]</sup>。

鲈形目 (Perciformes) 是硬骨鱼类中种类和数量最多的一个类群, 全球有 25 亚目 160 科 1 539 属 10 033 种, 绝大多数分布在海洋中, 其中石

收稿日期: 2020-06-30 修回日期: 2020-09-11

资助项目: 国家重点研发计划 (2017YFA0604904, 2019YFD0901204); 浙江省科技计划 (2019C02056)

第一作者: 孟玮 (照片), 从事水产生物学研究, E-mail: mengwei1982@hotmail.com

通信作者: 周永东, E-mail: zyd511@126.com



首鱼类是我国沿海地区重要的捕捞和养殖对象,在海洋渔业中占有重要地位<sup>[10-11]</sup>。日本黄姑鱼(*Nibea japonica*)俗称黑毛鲢、白鲢,是石首鱼科(Sciaenidae)黄姑鱼属(*Nibea*)近海暖温性中下层经济鱼类,喜栖息于100 m以内水深的岩礁和泥沙底质海域,主要分布于我国东海、南海及日本南部<sup>[9]</sup>。国内也有部分学者按照形态学和分子系统学特征将其纳入白姑鱼属(*Argyrosomus*),命名为日本白姑鱼(*A. japonicus*)<sup>[12-14]</sup>或日本银身鲷(*A. japonicus*)<sup>[15]</sup>。日本黄姑鱼作为我国重要的广盐性海洋经济鱼类,其适宜的盐度范围为18~30<sup>[16]</sup>,在纯淡水和盐度为55的情况下,最长存活时间分别可达到3和33 h<sup>[17]</sup>。其肉质鲜美、营养丰富、生长迅速且抗逆性强,成为近年来海水增养殖的优良品种<sup>[18-22]</sup>。目前关于盐度对日本黄姑鱼影响的研究主要集中在胚胎发育<sup>[21]</sup>、生理生态<sup>[22]</sup>、养殖试验<sup>[17]</sup>、生长免疫<sup>[16]</sup>等方面,盐度变化导致鱼类鳃丝、肠道、脑、肾脏及肝脏基因表达差异改变的报道较多<sup>[23-26]</sup>,但与日本黄姑鱼肉质密切相关的肌肉组织盐度适应机制及其功能基因表达与调控途径的研究尚未见。

本实验基于Illumina HiSeq™ 2500高通量测序平台,对不同急性盐度胁迫下日本黄姑鱼幼鱼肌肉组织进行转录组测序,通过基因富集分析及差异表达基因注释,找到与盐度变化相关的功能基因,采用实时荧光定量PCR技术测定盐度胁迫下基因的表达量,验证转录组数据的可靠性,为鱼类对盐度的适应机制研究提供资料,也为后续开展日本黄姑鱼功能基因挖掘和遗传育种研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本来源及实验设计

实验于2019年8月在浙江省海洋水产研究所西轩岛养殖试验基地进行,实验用水为盐度22的天然海水,经过消毒、过滤和沉淀,并充分曝气24 h以上获得。挑选100尾(体长3.6~4.0 cm、体质量0.9~1.1 g)健康日本黄姑鱼幼鱼暂养于直径2 m的室内PE桶内,并使用充氧泵不间断充氧,保持水中溶解氧含量高于5.0 mg/L,24.5~27.7 °C, pH 7.8~8.1。暂养期间每日8:00和14:00分别投喂饵料1次,投喂量为幼鱼体质量

的3%~5%,以减小水体中残饵量。每天清晨换水1次,换水同时清除底部污垢。1周后随机选取30尾幼鱼进行急性盐度胁迫实验,采取添加去氯自来水和海水素的方式,分别调整盐度至10(低盐组,LS)和33(高盐组,HS),另设盐度22的天然海水为对照组(C)。将每组10尾幼鱼直接置于不同盐度组别的玻璃水族箱中(长60 cm×宽35 cm×高45 cm)24 h过夜处理后,各选取3尾幼鱼用MS-222麻醉,剪取适量肌肉组织置于北京全式金生物RNAhold组织保存液中固定,带回实验室保存于-80 °C超低温冰箱备用。

### 1.2 RNA提取、文库构建和高通量测序

使用常规Trizol法分别提取3个组别(高盐、对照、低盐)肌肉组织总RNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA样品降解情况及是否存在基因组DNA污染<sup>[27]</sup>。采用Nanodrop 2000、Qubit 2.0和Aglient 2100方法检测RNA样品纯度、浓度和完整性,检验合格的样品送生工生物工程(上海)股份有限公司,采用NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep Kit完成cDNA文库的构建,基于Illumina HiSeq™ 2500高通量平台,以Paired-end 150 bp双末端测序模式分别对3个样本进行转录组测序。

### 1.3 转录组质控、组装和基因注释

使用FastQC对测序获得的原始数据进行质量评估,利用Trimmomatic<sup>[28]</sup>对接头进行剪切后得到相对准确的有效数据。使用Trinity 2.4<sup>[29]</sup>软件对处理后的有效数据进行拼接和De novo组装,使用软件TGICL 2.1<sup>[30]</sup>将得到的转录本(Transcripts)去冗余后,取聚类最长的转录本作为Unigene。运用Bowtie 2软件<sup>[31]</sup>将有效数据比对到拼接所得的Unigene上,并统计Mapping信息。采用NCBI数据库中Blast+<sup>[32]</sup>工具包(E-value<1×10<sup>-6</sup>)将Unigene与KOG(clusters of orthologous groups of proteins)、GO(gene ontology)、COG(clusters of orthologous groups of proteins)、NR(NCBI non-redundant protein sequences)、PFAM(protein family)、NT(NCBI nucleotide sequences)、Swiss-Prot(a manually annotated and reviewed protein sequence database)、KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)等多个数据库进行比对,获得与给定的Unigene具有最高序列相似度的蛋白,从而得到其蛋白功能注释信息。

#### 1.4 差异表达基因的 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

使用 DESeq 2 软件包<sup>[33]</sup> 检测差异表达基因 DEGs(differentially expressed genes), 以实现表达差异分析结果的可视化, 将  $Q$  value<0.05 且差异倍数|fold change|>2 设为筛选标准, 获得样品间的差异表达基因集。将 DEGs 与 CDD、KOG、COG、NR、NT、PFAM、Swissprot 和 TrEMBL 等数据库进行比对, 再以 E-value <  $10^{-6}$  为阈值, 运用 Blast 2 软件 GO<sup>[34]</sup> 将注释结果转换为可信的 GO 注释。通过 KAAS(KEGG automatic annotation server) 软件<sup>[35]</sup> 对差异基因进行 KEGG 通路富集分析, 以判定差异基因主要影响的生物学功能和通路。

#### 1.5 盐度适应相关基因预测和 qRT-PCR 验证

为预测 3 个梯度实验中与盐度相关的差异表达基因, 随机选择了 6 个差异表达基因, 使用 Primer Premier 6.0 软件<sup>[36]</sup> 设计引物, 并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 进行实时荧光定量 PCR 验证。

使用 Promega 公司 ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System 试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再以逆转录产物为模板、以  $\beta$ -actin 为内参基因(正向引物:  $\beta$ -actin-F 5'-AAGACTCCATACCGA GGAAAGA-3', 反向引物:  $\beta$ -actin-R 5'-TGAG CAGGAAATGGGCACT-3'), 使用 TaKaRa 公司 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>TM</sup> (TliRNase H Plus) 试剂盒, 在 Step One PULS 型 (ABI, USA) 荧光定量 PCR 仪上进行表达量分析。总体积 25  $\mu$ L 的反应体系: 稀释 10 倍后的 cDNA 模板 2.0  $\mu$ L, SYBR Premix

Ex Taq(2 $\times$ )12.5  $\mu$ L, 正反向引物各 0.5  $\mu$ L, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。反应程序: 95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环; 最后在 55~95  $^{\circ}$ C 制作熔解曲线。每组样品的每个基因均重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法分析基因的相对表达量,  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{test}) - \Delta C_t(\text{control})$ , 其中  $\Delta C_t(\text{test}) = C_t(\text{test, target}) - C_t(\text{test, reference})$ ,  $\Delta C_t(\text{control}) = C_t(\text{control, target}) - C_t(\text{control, reference})$ 。

## 2 结果

### 2.1 测序数据、De novo 组装和功能基因注释

基于边合成边测序 (sequencing by synthesis, SBS) 技术, 使用 Illumina HiSeq<sup>TM</sup> 2500 高通量测序平台进行转录组测序。高盐组 (HS)、低盐组 (LS) 和对照组 (C) 分别获得 7.37、5.72 和 6.11 GB 的原始数据, 过滤后分别得到约 5.27、4.87 和 5.53 GB 的 Clean reads, 相关数据已上传 SRA 数据库 (登录号 SAMN15963199, SAMN15963200, SAMN15963201), 具体信息见表 1。使用 Trinity 软件进行 De novo 组装后, 分别获得 91 667 条转录本, 进一步去冗余后拼接得到 61 601 条 Unigenes (表 2), 分别在 CDD (conserved domain database, 17995 个, 29.21%)、KOG(16451 个, 26.71%)、NR (34 646 个, 56.24%)、NT (45 130, 73.26%)、PFAM (13 930, 22.61%)、Swiss-Prot (27 569, 44.75%)、TrEMBL (European molecular biology laboratory nucleotide sequence database, 33 946, 55.11%)、GO (30 888, 50.14%) 和 KEGG (2 542, 4.13%) 数据库中得到注释, 其中有 562 条 Unigenes 在所有的蛋

表 1 各样本转录组测序数据信息

Tab. 1 Information of transcriptomic reads of each sample

样本 samples	高盐组 (HS) high salinity group	低盐组 (LS) low salinity group	对照组 (C) control group
原始读长 raw reads	49 158 278	38 158 758	40 732 610
原始碱基/bp raw bases	7 373 741 700	5 723 813 700	6 109 891 500
有效读长 clean reads	46 379 598	36 130 844	38 715 820
有效碱基/bp clean base	5 272 138 031	4 874 249 496	5 530 276 773
有效碱基比率/% clean bases ratio	94.35	94.69	95.05
平均读长/bp average read length	113.67	134.91	142.84
Q30碱基比率/% Q30 bases ratio	93.80	93.62	93.79
GC碱基比率/% GC bases ratio	50.57	50.99	50.20

表 2 3 组实验组装结果统计

Tab. 2 Statistics for the assembly of three experimental groups

类别 category	数目 number	≥500 bp	≥1 000 bp	N50	N90	全长/bp total length	平均长度/bp average length
转录本 transcript	91 667	47 392	30 393	2 085	390	98 642 848	1 076.1
基因 unigene	61 601	25 457	14 380	1 621	297	51 200 974	831.17

注：“N50 / N90”为按照长度将拼接转录本从大到小排序，累加转录本的长度，到不小于总长50% / 90%的拼接转录本的长度

Notes: N50 or N90 is computed by sorting all contigs from largest to smallest and by determining the minimum set of contigs whose sizes total 50% or 90% of the entire genome

白质数据库中均得到注释。不同盐度条件下，两两组间差异表达基因韦恩图显示 3 组样本共有 223 个 DEGs，其中胁迫组与对照组 (HS vs. C 和 LS vs. C) 之间的差异相较于两个胁迫组之间 (HS vs. LS) 要更大。

TPM(transcripts per million) 代表每百万 reads 中来自于某转录本的 reads 数，可用于衡量基因的相对表达量，能够对基因长度和测序深度进行标准化处理，更适合比较同一基因在不同样本间表达丰度的差异<sup>[37]</sup>。以基因表达量  $\log_2(\text{TPM})$  为纵坐标，不同组别为横坐标，每个区域的盒形图对应数据中的 5 个统计量 (至上而下分别为最大值、上四分位数 75%、中值 50%、下四分位数 25% 和最小值) 绘制箱线图，以直观反映数据的对称性和分布的分散程度 (图 1)。从图中可知，LS 组差异基因表达水平相较于对照组明显偏低。表达差异分析统计结果表明，不同组间共有 4 608 个 (HS vs. C 2 230 个、LS vs. C 1 377 个、HS vs. LS 1 001 个) 差异基因上调，4 455 个 (HS vs. C

1 959 个、LS vs. C 2 447 个、HS vs. LS 49 个) 差异基因下调。

## 2.2 盐度胁迫下差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集

GO 数据库是一个国际化的基因功能标准分类体系，通过 GO 功能显著性富集分析能确定差异表达基因行使的主要生物学功能。对得到的差异表达基因进行 GO 富集分析，61 601 条 Unigenes 共有 30 888 条得到了 GO 功能注释，占有 Unigenes 总量的 50.14%，这些基因分别富集到生物过程、细胞组分和分子功能 3 个类别体系中。其中，细胞组分类别中的细胞、细胞组件和细胞器、生物过程中的细胞过程以及分子功能中的绑定和催化活性功能相关的 Unigene 数目最多，而在成形态活性 (morphogen activity) 方面存在的差异表达基因数量最少，仅 2 个。从差异表达基因的 GO 富集分布散布图来看，HS vs C 和 LS vs C 两组均在细胞质方面富集量最高；HS vs LS 组则在补体激活中显示出最大的 Rich Factor 值，表明该 GO 条目富集程度最大；而 3 组都在胞外囊泡、胞外区部分、细胞外泌体等方面有富集 (图 2)。

以 KEGG 代谢途径数据库为依据，对差异表达基因 KEGG 的富集结果进行分类，并用超几何分布检验的方法计算每个 Pathway 条目中差异基因富集的显著性，以寻找不同样品的差异基因可能与哪些细胞通路的改变有关。富集结果显示，日本黄姑鱼肌肉组织 Unigenes 代谢途径可分成细胞进程、环境信息处理、遗传信息处理和新陈代谢 4 大类，33 个亚类。其中，两个胁迫组与对照组之间，与信号传导相关的通路均最多；而高盐组和低盐组之间除上述通路最多以外，转运与分解代谢通路也较多。此外，从 KEGG 富集散点图来看，MAPK、Rap1、NF 和 hedgehog 等信号通路均得到富集，这些信号通路

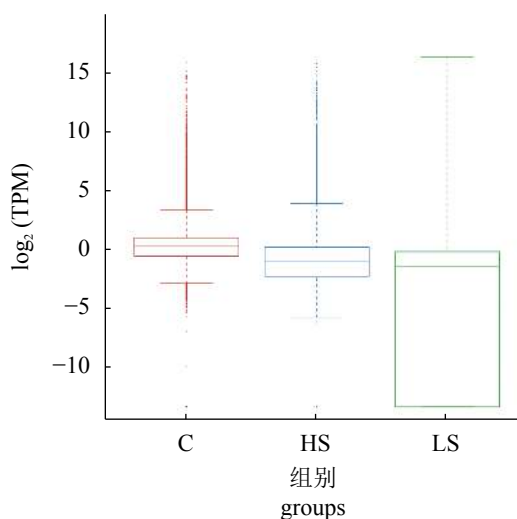


图 1 不同处理组差异基因表达水平的比较

Fig. 1 Comparison of DEGs expression levels in different treatment groups

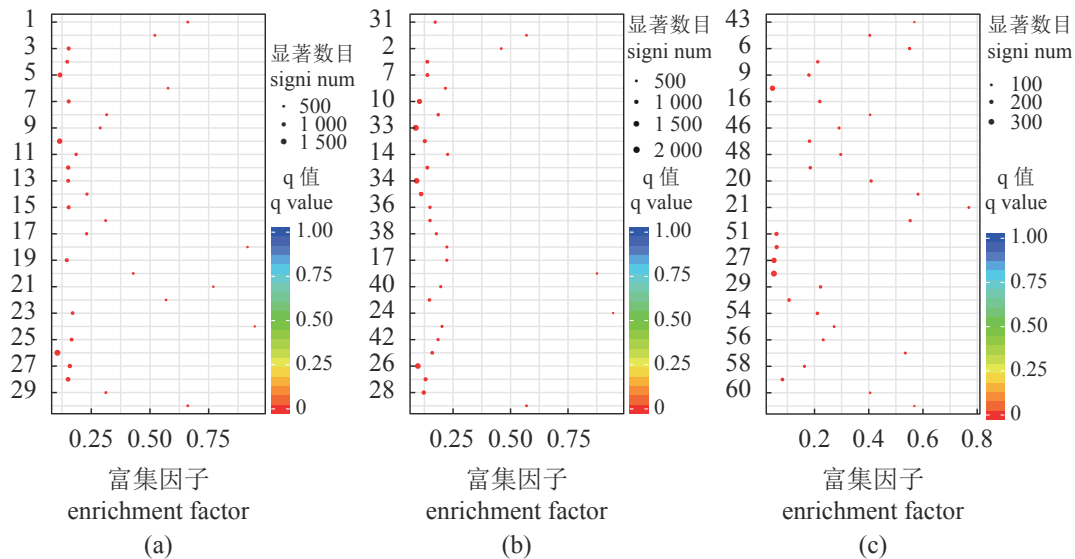


图 2 差异表达基因的 GO 富集分布散点图

(a) 高盐组 vs. 对照组, (b) 低盐组 vs. 对照组, (c) 高盐组 vs. 低盐组。1. GO: 1905369-内肽酶复合物, 2. GO: 1905368-肽酶复合物, 3. GO: 1903561-胞外囊泡, 4. GO: 1901575-有机物分解代谢过程, 5. GO: 1901564-有机氮化合物代谢过程, 6. GO: 0072376-蛋白质激活级联, 7. GO: 0070062-胞外体, 8. GO: 0061135-内肽酶调节活性, 9. GO: 0061134-肽酶调节活性, 10. GO: 0044444-细胞质部分, 11. GO: 0044429-线粒体部分, 12. GO: 0044421-胞外区部分, 13. GO: 0044248-细胞分解代谢过程, 14. GO: 0043292-收缩纤维, 15. GO: 0043230-细胞外细胞器, 16. GO: 0030414-肽酶抑制剂活性, 17. GO: 0030016-肌原纤维, 18. GO: 0022624-蛋白酶体复合物, 19. GO: 0009056-分解代谢过程, 20. GO: 0006959-体液免疫反应, 21. GO: 0006957-补体激活、替代途径, 22. GO: 0006956-补体激活, 23. GO: 0006508-蛋白质水解, 24. GO: 0005838-蛋白酶体调节粒子, 25. GO: 0005739-线粒体, 26. GO: 0005737-细胞质, 27. GO: 0005615-细胞外间隙, 28. GO: 0005576-胞外区, 29. GO: 0004866-内肽酶抑制剂活性, 30. GO: 0000502-蛋白酶体复合物, 31. GO: 1990904-核糖核蛋白复合物, 32. GO: 0044449-收缩纤维部分, 33. GO: 0044424-细胞外部分, 34. GO: 0043227-膜结合细胞器, 35. GO: 0032991-蛋白质复合物, 36. GO: 0031975-被膜, 37. GO: 0031967-细胞器膜, 38. GO: 0031966-线粒体膜, 39. GO: 0030017-肌原纤维节, 40. GO: 0019866-细胞器内膜, 41. GO: 0005743-线粒体内膜, 42. GO: 0005740-线粒体包膜, 43. GO: 2000257-蛋白质激活级联调节, 44. GO: 0072562-血液微粒, 45. GO: 0030247-多糖结合, 46. GO: 0019724-B 细胞介导免疫, 47. GO: 0017171-丝氨酸水解酶活性, 48. GO: 0016064-免疫球蛋白介导的免疫反应, 49. GO: 0008236-丝氨酸型肽酶活性, 50. GO: 0006958-补体激活、经典途径, 51. GO: 0006955-免疫应答, 52. GO: 0006952-防御应答, 53. GO: 0004857-酶抑制剂活性, 54. GO: 0004252-丝氨酸型内肽酶活性, 55. GO: 0003823-抗原结合, 56. GO: 0002526-急性炎症反应, 57. GO: 0002455-循环免疫球蛋白介导的体液免疫反应, 58. GO: 0002449-淋巴细胞介导免疫, 59. GO: 0002252-免疫效应过程, 60. GO: 0001871-结合模式, 61. GO: 0001848-补体结合

Fig. 2 GO enrichment scatters of the DEGs

(a) HS vs. C, (b) LS vs. C, (c) HS vs. LS, 1. GO: 1905369-endopeptidase complex, 2. GO: 1905368-peptidase complex, 3. GO: 1903561-extracellular vesicle, 4. GO: 1901575-organic substance catabolic process, 5. GO: 1901564-organonitrogen compound metabolic process, 6. GO: 0072376-protein activation cascade, 7. GO: 0070062-extracellular exosome, 8. GO: 0061135-endopeptidase regulator activity, 9. GO: 0061134-peptidase regulator activity, 10. GO: 0044444-cytoplasmic part, 11. GO: 0044429-mitochondrial part, 12. GO: 0044421-extracellular region part, 13. GO: 0044248-cellular catabolic process, 14. GO: 0043292-contraction fiber, 15. GO: 0043230-extracellular organelle, 16. GO: 0030414-peptidase inhibitor activity, 17. GO: 0030016-myofibril, 18. GO: 0022624-proteasome accessory complex, 19. GO: 0009056-catabolic process, 20. GO: 0006959-humoral immune response, 21. GO: 0006957-complement activation, alternative pathway, 22. GO: 0006956-complement activation, 23. GO: 0006508-proteolysis, 24. GO: 0005838-proteasome regulatory particle, 25. GO: 0005739-mitochondrion, 26. GO: 0005737-cytoplasm, 27. GO: 0005615-extracellular space, 28. GO: 0005576-extracellular region, 29. GO: 0004866-endopeptidase inhibitor activity, 30. GO: 0000502-proteasome complex, 31. GO: 1990904-ribonucleoprotein complex, 32. GO: 0044449-contraction fiber part, 33. GO: 0044424-intracellular part, 34. GO: 0043227-membrane-bounded organelle, 35. GO: 0032991-protein-containing complex, 36. GO: 0031975-envelope, 37. GO: 0031967-organelle envelope, 38. GO: 0031966-mitochondrial membrane, 39. GO: 0030017-sarcomere, 40. GO: 0019866-organelle inner membrane, 41. GO: 0005743-mitochondrial inner membrane, 42. GO: 0005740-mitochondrial envelope, 43. GO: 2000257-regulation of protein activation cascade, 44. GO: 0072562-blood microparticle, 45. GO: 0030247-polysaccharide binding, 46. GO: 0019724-B cell mediated immunity, 47. GO: 0017171-serine hydrolase activity, 48. GO: 0016064-immunoglobulin mediated immune response, 49. GO: 0008236-serine-type peptidase activity, 50. GO: 0006958-complement activation, classical pathway, 51. GO: 0006955-immune response, 52. GO: 0006952-defense response, 53. GO: 0004857-enzyme inhibitor activity, 54. GO: 0004252-serine-type endopeptidase activity, 55. GO: 0003823-antigen binding, 56. GO: 0002526-acute inflammatory response, 57. GO: 0002455-humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin, 58. GO: 0002449-lymphocyte mediated immunity, 59. GO: 0002252-immune effector process, 60. GO: 0001871-binding pattern, 61. GO: 0001848-complement binding

参与了许多生物学过程，与渗透压调节也有一定的相关性。

### 2.3 离子通道和离子转运体相关基因

通过对离子通道相关的显著差异表达基因进行筛选，发现高盐组共有 21 个基因表达量发生了显著改变，其中 10 个基因上调、11 个基因下调。低盐组有 41 个基因表达量发生了显著变化，表现为 14 个基因上调、27 个基因下调。取两个胁迫组显著差异表达基因的交集进行分析，共检测到 15 个与离子通道相关的基因(表 3)，仅 1 个基因(*TRINITY\_DN12918\_c0\_g1*)在两组中表达趋势相反。14 个均呈现出相同表达趋势的基因中，有 4 个基因上调、10 个基因下调。对这一个表达趋势相反的基因进行了 2 个生物学重复

的定量 PCR 验证，发现高盐组与低盐组表达趋势是一致的。该基因在 NT 数据库中注释为 *FXDY12* (*FXDY domain-containing ion transport regulator 12*) 基因。此外，在高盐组中发现 6 个离子转运体基因显著差异表达，其中 4 个基因上调，2 个基因下调；在低盐组发现 10 个离子转运体基因显著差异表达，其中 4 个基因上调，6 个基因下调。

### 2.4 实时荧光定量 PCR

从两组实验分析结果中随机挑选 6 条差异表达显著的基因，使用荧光定量 PCR 相对定量法检测胁迫组与对照组基因的表达情况，并与转录组分析结果进行比较，得到的基因表达量的结果与转录组测序所得结果趋势一致，证实了转录组分析结果的可靠性(图 3)。

表 3 显著差异表达的离子通道相关基因

Tab. 3 Significantly differentially expressed related genes on ion channels

基因编号 gene ID	高盐组 (HS) high salinity group		低盐组 (LS) low salinity group		注释 annotation
	上调/下调 up/down	对数化倍数 $\log_2(\text{fold change})$	上调/下调 up/down	对数化倍数 $\log_2(\text{fold change})$	
	<i>TRINITY_DN16810_c0_g2</i>	上调	1.145	上调	
<i>TRINITY_DN17809_c2_g1</i>	下调	-1.195	下调	-1.384	三磷酸腺苷门控阳离子通道 ATP-gated cation channel
<i>TRINITY_DN18319_c5_g1</i>	下调	-1.247	下调	-1.336	多囊蛋白阳离子通道 polycystin cation channel
<i>TRINITY_DN19120_c2_g6</i>	下调	-1.018	下调	-1.097	电压依赖性阴离子通道1 voltage-dependent anion channel 1
<i>TRINITY_DN17668_c2_g1</i>	下调	-1.249	下调	-1.222	瞬时受体电位阳离子通道 transient receptor potential cation channel
<i>TRINITY_DN18606_c2_g1</i>	下调	-1.980	下调	-1.771	电压依赖性阴离子通道2 voltage-dependent anion channel 2
<i>TRINITY_DN19042_c4_g6</i>	上调	1.178	上调	1.123	钾离子通道 K <sup>+</sup> channel
<i>TRINITY_DN17894_c2_g2</i>	上调	5.037	上调	4.380	电压门控性钙通道活性 voltage-gated calcium channel activity
<i>TRINITY_DN18240_c4_g1</i>	上调	1.945	上调	1.352	离子通道结合 ion channel binding
<i>TRINITY_DN12942_c0_g1</i>	下调	-1.618	下调	-1.692	离子通道活性 ion channel activity
<i>TRINITY_DN12918_c0_g1</i>	下调	-1.696	上调	3.230	离子通道活性 ion channel activity
<i>TRINITY_DN14528_c0_g1</i>	下调	-1.803	下调	-3.156	离子通道活性 ion channel activity
<i>TRINITY_DN18945_c3_g4</i>	下调	-2.115	下调	-2.417	电压门控离子通道活性 voltage-gated ion channel activity
<i>TRINITY_DN18609_c2_g1</i>	下调	-2.323	下调	-2.322	钙离子通道活性 Ca <sup>2+</sup> channel activity
<i>TRINITY_DN18656_c11_g2</i>	下调	-3.001	下调	-3.033	氯离子通道活性 Cl <sup>-</sup> channel activity

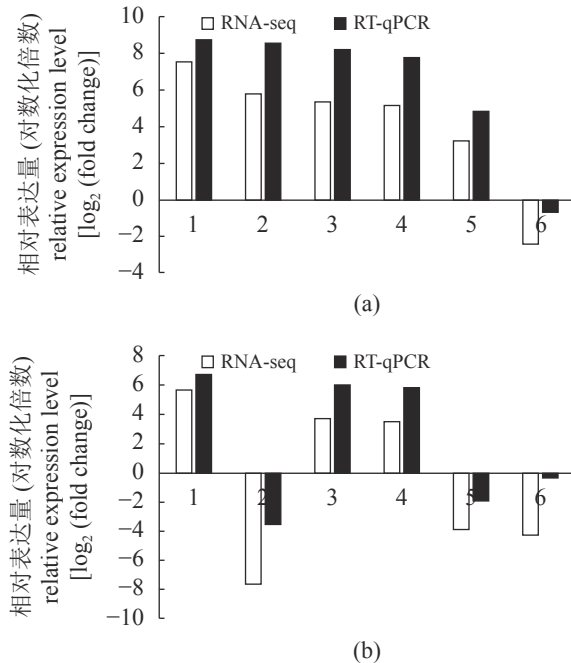


图3 实时荧光定量PCR与转录组检测基因差异倍数的比较分析

(a)高盐组, (b)低盐组。1. *TRINITY\_DM13955\_c0\_g1* 基因, 2. *TRINITY\_DM17393\_c2\_g3* 基因, 3. *TRINITY\_DM16894\_c3\_g4* 基因, 4. *TRINITY\_DM17965\_c0\_g4* 基因, 5. *TRINITY\_DM23523\_c0\_g1* 基因, 6. *TRINITY\_DM15840\_c0\_g1* 基因

Fig. 3 Comparative analysis of DEGs by qRT-PCR and transcriptome

(a) high salinity group, (b) low salinity group, 1. *TRINITY\_DM13955\_c0\_g1* gene, 2. *TRINITY\_DM17393\_c2\_g3* gene, 3. *TRINITY\_DM16894\_c3\_g4* gene, 4. *TRINITY\_DM17965\_c0\_g4* gene, 5. *TRINITY\_DM23523\_c0\_g1* gene, 6. *TRINITY\_DM15840\_c0\_g1* gene

### 3 讨论

本研究首次利用高通量测序技术, 比较了两种盐度胁迫模式下日本黄姑鱼肌肉转录组和差异基因的表达情况。通过比较发现, 在低盐条件下, 日本黄姑鱼转录组差异基因表达水平相较于高盐组偏低, 与离子通道相关的上、下调基因数量也均多于高盐组。推测低盐环境条件对日本黄姑鱼影响更大。广盐性鱼类在不同盐度下维持渗透压所消耗的能量不同<sup>[38]</sup>, 从而造成长和食物转化效率的改变。例如大西洋鳕(*Gadus morhua*)<sup>[39]</sup>和斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)<sup>[40]</sup>在低盐度条件下的成活率、生长率和食物转化率均高于天然海水。因此, 选育能够适应低盐环境, 积累更多能量用于生长的品种, 是海水鱼类遗传育种的一个重要方向。

GO功能富集中, HS vs. C和LS vs. C组在

蛋白酶体相关功能上 Rich Factor值最大, 蛋白酶体的主要作用是降解细胞不需要的或受到损伤的蛋白质, 这一作用是通过打断肽键的化学反应来实现的<sup>[41]</sup>。盐度急性改变对于鱼类来说是一种环境胁迫, 细胞内液盐度的改变可能会使某些蛋白质变性, 机体通过蛋白酶体做出应激反应(图2中24.GO)。GO功能分类中, 分子功能大类中的绑定和催化活性方面有较多富集, 对日本鳎(*Charybdis japonica*)<sup>[42]</sup>、黄盖鲽(*Pseudopleuronectes yokohamae*)<sup>[43]</sup>和暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)<sup>[44]</sup>等海洋生物盐度调控机制的研究也发现, 不同盐度胁迫下差异基因功能主要富集在催化活性条目下。此外, GO功能富集结果显示, HS vs C和LS vs C组在细胞质方面显著富集的基因数量最多, 并且3组实验中的细胞外组分(胞外囊泡、细胞外泌体和胞外区部分)均有显著富集(图2中的3.GO、7.GO和12.GO)。前者与细胞液相关, 后者与细胞外液相关, 推测盐度可能改变了这些液体的渗透压, 进而影响了细胞的内外环境, 使得生物有机体对此做出应答。

HS vs. LS组在急性炎症反应条目呈现显著富集(图2中的56.GO), 急性炎症反应主要以细胞免疫为主, 表明盐度变化改变了鱼类的先天免疫。此外, 体液免疫即获得性免疫也得到显著富集(图2中的20.GO), 有研究将虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)由淡水移植到海水环境中后, 发现特异性抗体数量减少<sup>[45]</sup>。自然免疫反应过程中, 当补体系统的某些激活物被活化后, 会生成具有溶菌和调理作用的酶, 将先天免疫和获得性免疫有机结合起来<sup>[46]</sup>。本研究中, HS vs. LS组在与免疫相关的补体激活方面 Rich Factor值最高(图2中的21.GO), 补体激活的3条途径均需要钙离子和镁离子的参与, 盐度改变可能会影响这些离子的浓度, 进而影响免疫系统。例如, 盐度急剧变化会导致褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)血清中凝血活性、溶菌酶以及补体因子C3等非特异性免疫因子的改变<sup>[47]</sup>。此外, 还有研究表明, 盐度驯化改变了宽吻海龙(*Syngnathus typhle*)免疫细胞的增殖活性, 低盐度驯养条件下宽吻海龙免疫细胞增殖和免疫基因表达较正常环境条件下偏低<sup>[48]</sup>。表明盐度变化影响免疫功能是多方面的, 机体的众多生化反应需要无机离子的参与, 而盐度变化通过影响无机离子的动态平衡进而

影响免疫功能。

对差异表达基因的 KEGG 通路分析结果表明, HS vs. C 和 LS vs. C 均表现为信号传导相关通路最多, HS vs. LS 除此以外还在运输和分解代谢信号通路方面也有较多富集, 鱼类调节机体渗透压以适应不同盐度环境, 依赖于溶质和水分子的被动和主动运输。无机离子可以改变某些酶的催化活性, 进而触发一系列代谢反应<sup>[49]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是一种存在于真核生物细胞中的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶, 最早由 Ray 等<sup>[50]</sup>从 3T3-L1 脂肪母细胞提取物中分离纯化而来, 在细胞内起着协调代谢与能量平衡的重要作用, 其活性主要受 AMP 和 ATP 的比例调控<sup>[51]</sup>。HS vs. C 和 LS vs. C 两组均在 MAPK 信号通路中有富集。盐度变化通过改变代谢反应而影响能量的产生, 也即 AMP 和 ATP 的比例, 从而影响了 MAPK 信号通路的活性。

通过对离子通道相关基因进行筛选, 高渗组特有的离子通道基因数量低于低渗组, 本研究发现高渗组和低渗组共有的离子通道相关基因的表达变化趋势一致, 仅有 1 个基因出现相反趋势。高渗和低渗对机体的胁迫性具有相似性, 只是浓度梯度的方向不同, 而机体离子通道相关基因对其做出的应激调整策略是相似的。本研究中发现钙离子通道也参与了渗透压调节, 表明渗透压调节是通过多种阳离子、阴离子通道互相作用实现的, 包括钠离子、氯离子、钾离子和钙离子通道。除离子通道相关基因外, 还发现了一定数量的离子转运体基因, 表明渗透压调节包括顺浓度梯度的被动转运, 也包括消耗 ATP 的主动转运。FXD12 基因通过调节 NKA(钠-钾 ATP 酶) 活性来维持内环境平衡<sup>[52]</sup>。本研究中 FXD12 基因转录组数据与定量 PCR 数据存在不一致现象, 其与盐度作用的关系有待于进一步研究。

本研究基于 Illumina HiSeq™ 2500 测序平台, 采用 RNA-Seq 技术探究了日本黄姑鱼在不同渗透压环境下的适应和调节的过程。研究发现, 肌肉组织表达基因发生了较大改变, 表明不仅鳃和肾脏对盐度改变有响应, 其他组织也不同程度的参与了盐度适应的生理过程, 例如心脏组织搏动受钾离子通道影响, 盐度改变会影响

钾离子通道从而影响心脏组织。箱线图显示低盐组和对照组之间的差异基因表达水平具有明显不同, GO 富集分析在多个条目显著富集, 适应盐度胁迫环境下的日本黄姑鱼肌肉组织 MAPK、催化活性、信号传导通路都产生了变化, 离子通道相关基因发生显著变化。以上结果表明日本黄姑鱼对盐度适应是一个涉及多器官、多基因的复杂过程, 低盐对离子通道相关基因影响更大。本研究结果可为日本黄姑鱼盐度驯化和遗传育种研究提供科学依据。

#### 参考文献 (References):

- [1] 王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响[J]. 海洋科学集刊, 2002(1): 151-158.  
Wang Y F, Zhu X H. A review on impact of salinity on patterns of fish ecophysiology[J]. *Studia Marina Sinica*, 2002(1): 151-158(in Chinese).
- [2] Kültz D. Physiological mechanisms used by fish to cope with salinity stress[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2015, 218(12): 1907-1914.
- [3] Boeuf G, Payan P. How should salinity influence fish growth?[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130(4): 411-423.
- [4] Gonzalez R J. The physiology of hyper-salinity tolerance in teleost fish: a review[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2012, 182(3): 321-329.
- [5] 康自强, 邓超准, 于慧娟, 等. 盐度对鱼类的影响[J]. 福建水产, 2013, 35(5): 395-401.  
Kang Z Q, Deng C Z, Yu H J, *et al.* Study advances in the effect of salinity change on fish[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2013, 35(5): 395-401(in Chinese).
- [6] Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2009, 10(1): 57-63.
- [7] 祁云霞, 刘永斌, 荣威恒. 转录组研究新技术: RNA-Seq 及其应用[J]. 遗传, 2011, 33(11): 1191-1202.  
Qi Y X, Liu Y B, Rong W H. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics[J]. *Hereditas*, 2011, 33(11): 1191-1202(in Chinese).
- [8] Smith S, Bernatchez L, Beheregaray L B. RNA-seq analysis reveals extensive transcriptional plasticity to temperature stress in a freshwater fish species[J]. *BMC Gen-*



- omics, 2013, 14(1): 375.
- [9] Qian X, Ba Y, Zhuang Q F, *et al.* RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics[J]. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 2014, 18(2): 98-110.
- [10] Nelson J S. Fishes of the World[M]. 4th ed. New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc., 2006.
- [11] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2016.
- Chen D G, Zhang M Z. Marine fishes of China[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2016 (in Chinese).
- [12] 赵盛龙, 徐汉祥, 钟俊生, 等. 浙江海洋鱼类志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2016.
- Zhao S L, Xu H X, Zhong J S, *et al.* Marine fishes of Zhejiang Province[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 2016 (in Chinese).
- [13] 赵林林. 两种海洋鱼类的遗传多样性及基于线粒体基因组的石首鱼科系统发育研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- Zhao L L. Genetic diversity of two marine fishes and phylogeny of Sciaenidae based on mitochondrial genome[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015 (in Chinese).
- [14] 郭昶畅. 中国沿海石首鱼科鱼类的鉴定、分类和分子系统发育研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2017.
- Guo C C. Identification, classification and molecular phylogeny of Sciaenidae species from Chinese waters[D]. Xiamen: Xiamen University, 2017 (in Chinese).
- [15] 吕金磊. 中国近海石首鱼科鱼类 DNA 条形码及分子系统学研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2017.
- Lv J L. DNA barcoding and molecular phylogeny of Sciaenidae in coastal waters of China[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017 (in Chinese).
- [16] 王跃斌, 胡则辉, 朱云海, 等. 盐度对日本黄姑鱼生长及非特异性免疫的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2015, 34(1): 26-31.
- Wang Y B, Hu Z H, Zhu Y H, *et al.* Effects of salinity on growth and non-specific immunity of *Nibea japonica*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2015, 34(1): 26-31(in Chinese).
- [17] 姜秀凤, 于清海, 王玉芬. 日本黄姑鱼耐温耐盐试验报告[J]. 河北渔业, 2009(11): 11, 18.
- Jiang X F, Yu Q H, Wang Y F. Experiment report on temperature and salt tolerance of *Nibea japonica*[J]. Hebei Fisheries, 2009(11): 11, 18(in Chinese).
- [18] 苏跃中, 金汉锋, 王珍贵, 等. 日本黄姑鱼人工繁殖及苗种培育技术的初步研究[J]. 中国水产, 1994(2): 32-33, 35.
- Su Y Z, Jin H F, Wang Z G, *et al.* Preliminary studies on artificial propagation and fry rearing technique on *Nibea japonica*[J]. China Fisheries, 1994(2): 32-33, 35(in Chinese).
- [19] 毛小伟, 兰时乐, 肖调义, 等. 日本黄姑鱼养殖生物学研究进展[J]. 水产科学, 2012, 31(4): 245-248.
- Mao X W, Lan S L, Xiao T Y, *et al.* Research progress on culture biology of Japanese croaker *Nibea japonica*[J]. Fisheries Science, 2012, 31(4): 245-248(in Chinese).
- [20] 梁君, 王伟定, 林桂装, 等. 浙江舟山人工生境水域日本黄姑鱼和黑鲷的增殖放流效果及评估[J]. 中国水产科学, 2010, 17(5): 1075-1084.
- Liang J, Wang W D, Lin G Z, *et al.* Effect and assessment of enhancement release of *Nibea japonica* and *Sparus macrocephalus* in artificial reef habitat waters of Zhoushan, Zhejiang[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(5): 1075-1084(in Chinese).
- [21] 柴学军, 孙敏, 许源剑. 温度和盐度对日本黄姑鱼胚胎发育的影响[J]. 南方水产科学, 2011, 7(5): 43-49.
- Chai X J, Sun M, Xu Y J. Effects of temperature and salinity on embryonic development of *Nibea japonica*[J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(5): 43-49(in Chinese).
- [22] 柴学军, 胡则辉, 徐君卓, 等. 盐度和pH对日本黄姑鱼幼鱼耗氧率和排氨率的影响[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2009, 28(2): 146-150.
- Cai X J, Hu Z H, Xu J Z, *et al.* Effect of salinity and pH on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate in juvenile *Nibea japonica*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2009, 28(2): 146-150(in Chinese).
- [23] 崔文晓. 大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*) 盐度胁迫转录组构建及相关功能基因研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
- Cui W X. Construction of transcriptome under salinity stress and research of related functional genes on turbot

- (*Scophthalmus maximus*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [24] 孙梦蕾. 基于转录组技术揭示红鳍东方鲀的渗透压调节机制 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2017.
- Sun M L. Revealing osmotic pressure regulating mechanism of *Takifugu rubripes* based on transcriptome technology[D]. Dalian: Dalian Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [25] 邝杰华, 马骞, 毛非凡, 等. 低盐胁迫下松江鲈HSPB1、HSPB7和HSPB11基因的表达变化规律[J]. 中国水产科学, 2020, 27(5): 494-503.
- Kuang J H, Ma Q, Mao F F, *et al.* Effects of low salinity stress on the expression profiling of *HSPB1*, *HSPB7*, and *HSPB11* in the roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(5): 494-503(in Chinese).
- [26] Cao D Y, Li J F, Huang B S, *et al.* RNA-seq analysis reveals divergent adaptive response to hyper- and hypo-salinity in cobia, *Rachycentron canadum*[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2020, 46(5): 1713-1727.
- [27] 格林 M R, 萨姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南 [M]. 贺福初, 陈薇, 杨晓明, 译. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 2017.
- Green M R, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. He F C, Chen W, Yang X M, trans, 4th ed. Beijing: Science Press, 2017 (in Chinese).
- [28] Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [29] Haas B J, Papanicolaou A, Yassour M, *et al.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis[J]. *Nature protocols*, 2013, 8(8): 1494-1512.
- [30] Pertea G, Huang X Q, Liang F, *et al.* TIGR gene indices clustering tools (TGICL): a software system for fast clustering of large EST datasets[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(5): 651-652.
- [31] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Conesa A, Götz S, García-Gómez J M, *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [35] Moriya Y, Itoh M, Okuda S, *et al.* KAAS: an automatic genome annotation and pathway reconstruction server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(Suppl 2): W182-W185.
- [36] Singh V K, Mangalam A K, Dwivedi S, *et al.* Primer premier: program for design of degenerate primers from a protein sequence[J]. *Biotechniques*, 1998, 24(2): 318-319.
- [37] Alvarez R V, Pongor L S, Mariño-Ramírez L, *et al.* TPMCalculator: one-step software to quantify mRNA abundance of genomic features[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(11): 1960-1962.
- [38] Brett J R. Environmental factors and growth[J]. *Fish Physiology*, 1979, 8: 599-675.
- [39] Lambert Y, Dutil J D, Munro J. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*)[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1994, 51(7): 1569-1576.
- [40] 冯连华. 低盐环境对斜带石斑鱼幼鱼生长、生理的影响 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2012.
- Feng L H. Effects of low salinity on growth and physiology of juvenile orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*)[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012 (in Chinese).
- [41] Schubert U, Antón L C, Gibbs J, *et al.* Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes[J]. *Nature*, 2000, 404(6779): 770-774.
- [42] 王余菊. 温度和盐度胁迫下日本蟳转录组响应表达研究 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2019.
- Wang Y J. Transcriptome response of *Charybdis japonica* exposed to temperature and salinity stresses[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2019 (in Chinese).
- [43] Cui Q J, Qiu L H, Yang X, *et al.* Transcriptome profil-

- ing of the low-salinity stress responses in the gills of the juvenile *Pseudopleuronectes yokohamae*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2019, 32: 100612.
- [44] 王骏. 暗纹东方鲀耐受盐度能力的环境因子效应及其在转录组学水平上的差异 [D]. 南京: 南京师范大学, 2018.
- Wang J. Effects of environmental factors on the tolerance of *Fugu obscurus* to salinity and the differences on transcriptome level[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2018 (in Chinese).
- [45] Betoulle S, Troutaud D, Khan N, *et al.* Antibody response, cortisolemia and prolactinemia in rainbow trouts[J]. *Comptes Rendus de L' academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 1995, 318(6): 677-681.
- [46] Abe M. Complement activation and inflammation[J]. *Rinsho Byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology*, 2006, 54(7): 744-756.
- [47] 魏然, 张士瑾, 王长法, 等. 盐度对牙鲆非特异性免疫功能的影响[J]. *海洋科学进展*, 2003, 21(2): 209-213.
- Wei R, Zhang S C, Wang C F, *et al.* Effects of changes in salinity on nonspecific immune function of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. *Advances in Marine Science*, 2003, 21(2): 209-213(in Chinese).
- [48] Birrer S C, Reusch T B H, Roth O. Salinity change impairs pipefish immune defence[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(6): 1238-1248.
- [49] Schoffeniels E. Adaptations with respect to salinity[J]. *Biochemical Society Symposium*, 1976(41): 179-204.
- [50] Ray L B, Sturgill T W. Characterization of insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase. Rapid isolation and stabilization of a novel serine/threonine kinase from 3T3-L1 cells[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1988, 263(25): 12721-12727.
- [51] 范衡宇, 佟超, 孙青原. 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK) 信号通路的研究进展[J]. *动物学杂志*, 2002, 37(5): 101-105.
- Fan H Y, Tong C, Sun Q Y. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways: state of the art[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2002, 37(5): 101-105(in Chinese).
- [52] Yang W K, Kang C K, Hsu A D, *et al.* Different modulatory mechanisms of renal FXYD12 for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase between two closely related medakas upon salinity challenge[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2016, 12(6): 730-745.

## Transcriptome analysis of *Nibea japonica* under acute salinity stress

MENG Wei, XU Kaida, LI Zhenhua, SHI Huilai, ZHOU Yongdong\*

(Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province,  
Key Laboratory of Sustainable Utilization of Technology Research for Fisheries Resources of Zhejiang Province,  
Scientific Observing and Experimental Station of Fishery Resources for Key Fishing Grounds,  
Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Zhoushan 316021, China)

**Abstract:** Salinity is an important environmental factor that affects the physiological activities of fish. In order to investigate the changes of gene expression level in *Nibea japonica*, an economic marine fish treated by acute salinity stress, the transcriptomes of muscle tissues under different salinity conditions were sequenced based on the Illumina HiSeq™ 2500 high-throughput sequencing platform and the data were analyzed by bioinformatics tools in this study. A total of 46 379 598 (5.27 Gb), 36 130 844 (4.87 Gb) and 38 715 820 (5.53 Gb) clean reads were obtained in the high salinity group (HS), the low salinity group (LS) and the control group (C), respectively. 91 667 transcripts were assembled and 61 601 unigenes were spliced after removing redundancy. Compared with the control group, 2 230 and 1 377 differential expression genes (DEGs) were up-regulated, while 1 959 and 2 447 DEGs were down-regulated in the high salinity group and the low salinity group, respectively. Six DEGs were randomly selected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the results were consistent with the RNA-seq. 21 and 41 ion channel genes were obtained from all significant DEGs in high salinity group and low salinity group, respectively. Fourteen of 15 shared genes showed the same trend. By contrast, 6 and 10 ion transporter genes were acquired from the significant DEGs of two groups. The results of GO functional enrichment showed that the DEGs were significantly enriched in proteasome and complement activation, and KEGG pathway enrichment suggested that the DEGs were enriched in binding, catalytic activity, signal transduction and catabolism. The results indicated that the salinity adaptation of *N. japonica* is a complex process involving multiple tissues and genes. Besides the change of ion channels and ion transporters, the change of salinity also affects the protein degradation and immune system. The findings will provide important references for further study on the regulation mechanism of salinity adaptation and breeding of *N. japonica*.

**Key words:** *Nibea japonica*; acute salinity stress; muscle; RNA-seq; ion channel; ion transporter

**Corresponding author:** ZHOU Yongdong. E-mail: zyd511@126.com

**Funding projects:** National Key Research and Development Plan of China (2017YFA0604904, 2019YFD0901204); Science and Technology Project of Zhejiang Province (2019C02056)