

文章编号: 1000-0615(2016)09-1289-10

DOI: 10.11964/jfc.20151110165

## 饲料VD<sub>3</sub>水平对黄颡鱼转录组差异基因表达的影响

冯美惠, 陈沛, 段鸣鸣, 王春芳\*

(华中农业大学水产学院, 大宗淡水鱼产业技术体系华中区养殖岗位,  
池塘健康养殖湖北省工程实验室, 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心,  
农业部淡水生物繁育重点实验室, 湖北武汉 430070)

**摘要:** 为研究饲料中添加维生素D<sub>3</sub>对黄颡鱼基因表达的影响, 实验基于RNA-Seq技术对用添加不同水平维生素D<sub>3</sub>[0(VD0), 1243(VD2), 22 700(VD20) IU/kg]的饲料喂养的黄颡鱼肾脏和小肠的转录组数据进行分析。通过对305 568 982条原始reads的筛选和排除, 得到了83 265条unigenes, 平均长845.38 nt, N<sub>50</sub>为1620 nt。利用Blast等相关软件对数据进行深度分析, 得到功能注释基因共29 224个。根据GO富集分析发现, 差异表达基因主要集中在细胞过程、代谢通路、生物调控等通路中, KEGG pathway富集分析结果显示, 代谢通路涉及基因最多, 有1532个。相对于对照组, 添加1243和22 700 IU/kg的VD<sub>3</sub>(VD0 vs VD2/VD0 vs VD20)可得到共同上下调基因共380个, 其中上调基因266个, 下调基因114个; 3种水平下共同上下调的基因共21个, 其中上调基因4个, 下调基因17个。研究表明, 在饲料中添加不同浓度维生素D<sub>3</sub>会对黄颡鱼的生长代谢和生物调控等相关基因表达产生影响, 且不同浓度实验组, 相关基因的表达存在差异。本实验通过对差异表达基因的后续分析及预测, 为黄颡鱼的生长代谢及疾病预防等方面的研究提供了丰富的数据来源。

**关键词:** 黄颡鱼; 维生素D<sub>3</sub>; 转录组分析; 基因表达

**中图分类号:** S 963.7

**文献标志码:** A

维生素D是一种脂溶性维生素, 是鱼类生长的必需营养素, 主要包括维生素D<sub>2</sub>(麦角钙化醇)和维生素D<sub>3</sub>(胆钙化醇, VD<sub>3</sub>)。其在体内的活化形式1, 25-二羟维生素D<sub>3</sub>(1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>)是动物机体内调节钙磷平衡的主要激素之一<sup>[1]</sup>, 对维持鱼体钙磷平衡发挥着重要作用。目前研究显示, 饲料中添加维生素D<sub>3</sub>对松浦镜鲤(*Cyprinus carpio Songpu mirror carp*)<sup>[2-3]</sup>、草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)<sup>[4]</sup>、黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)<sup>[5]</sup>、黄鳝(*Monopterus albus*)<sup>[6]</sup>等的生长、免疫等指标都存在一定的影响。虽然维生素D<sub>3</sub>对于黄颡鱼的影响在生理生化层面有一定的研究, 但在转录组水平上的研究还不多见<sup>[7]</sup>。

近些年来, 转录组学技术在水产动物免疫、

发育、营养等各个方向的应用日渐广泛, 诸多研究人员致力于转录组学研究并将其与生产实践相结合, 应用于水产发展的各项领域。由于其不依赖于基因组序列信息, 因此对于未知基因组序列信息的非模式生物具有极大的价值<sup>[8]</sup>。RNA-seq技术作为新一代高通量测序技术即转录组测序技术, 具有通量高、灵敏度高、分辨率高、不受限制等优点, 可用于检测新的转录本、研究基因转录水平、研究非编码区域功能、研究转录本结构变异、开发SNP和SSR等<sup>[9-10]</sup>。在草鱼<sup>[11]</sup>、乌鳢(*Channa argus*)<sup>[12]</sup>、斑鳢(*Channa maculatus*)<sup>[12]</sup>、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)<sup>[13]</sup>、鲢(*Cirrhina molitorella*)<sup>[14]</sup>等多种水产动物都利用此项技术在鱼类抗病研究, 遗传育种等领域取

收稿日期: 2015-11-20 修回日期: 2016-06-07

资助项目: 国家自然科学基金(31172421)

通信作者: 王春芳, E-mail: cfwang@mail.hzau.edu.cn

得了突破性进展。

黄颡鱼, 鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagridae), 黄颡鱼属(*Pelteobagrus*), 是一种小型的淡水经济鱼类, 肉质鲜美, 营养丰富, 深受消费者的喜爱, 近年来在两湖(湖南、湖北)和两江(江西、江苏)等地的消费量尤其大。黄颡鱼以其生长周期短、群体产量高、经济效益高、适温性广的特点, 而备受养殖业关注。同时, 在全国各地均有养殖, 且因其为底栖鱼类, 适宜与各种鱼混养, 人工养殖的规模逐渐扩大。本实验采用RNA-seq技术对饲料中添加不同水平VD<sub>3</sub>的黄颡鱼小肠和肾脏进行转录组测序, 全面探讨不同VD<sub>3</sub>水平下黄颡鱼小肠和肾脏转录组的基本信息, 分析由饲料VD<sub>3</sub>水平引起的差异基因转录表达状况, 为今后黄颡鱼分子标记开发、生长、免疫等重要性状相关基因克隆及功能分析等研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 养殖实验及样品采集

从武汉正好鱼苗厂购买约600尾黄颡鱼, 随机放入10个有机玻璃纤维缸中(体积, 395 L)暂养, 实验在华中农业大学南湖水产基地进行。为了使实验鱼适应养殖环境以及排空鱼体内的VD<sub>3</sub>, 暂养2周, 暂养期间投喂不含VD<sub>3</sub>的对照组饲料。暂养结束后, 实验鱼饥饿24 h后称重, 挑选出体格健壮、规格一致的黄颡鱼(2.0±0.5) g 450尾随机分为3组, 每组设3缸重复, 每缸50尾鱼。每组分别投喂含量为0(VD<sub>0</sub>), 1243(VD<sub>2</sub>), 22 700(VD<sub>20</sub>) IU/kg VD<sub>3</sub>饲料。该实验中VD<sub>3</sub>浓度的选取参考本课题组前期养殖实验<sup>[5]</sup>。选取不添加VD<sub>3</sub> (VD<sub>0</sub>)为对照组, 中等添加水平1243 IU/kg (VD<sub>2</sub>)和高剂量添加水平22 700 IU/kg (VD<sub>20</sub>)为处理组, 以此来凸显不同VD<sub>3</sub>添加水平对转录组可能引起的差异基因表达的影响。养殖实验持续12周, 采取限制性投喂策略, 一天的投喂量为鱼重的5%, 每天投喂2次(08:30和14:30), 每两周全缸称重以调整投喂量。期间水流约为1.5 L/min, 水温16.0~24.8 °C, 溶解氧大于6.0 mg/L, 氨氮低于0.5 mg/L, pH为8.0±0.1。饲料配方等参照段鸣鸣等<sup>[5]</sup>的方法。

养殖实验结束后, 实验鱼饥饿24 h, 每缸取大小均一的黄颡鱼3尾, 用MS222(200 mg/L)麻醉后分别取肠和肾脏组织。每个处理组3个平行,

每个平行各取3条鱼, 即每个处理共取9条黄颡鱼, 并将9条黄颡鱼的小肠和肾脏分别放入1.5 mL EP管中, 并迅速转移到液氮罐中冻存, 然后放入-80 °C中保存备用。

### 1.2 RNA提取

将组织置于研钵中, 倒入液氮后迅速开始研磨, 直至粉状后使用TRIzol (Invitrogen, 美国)试剂对总RNA进行提取, 总RNA的纯度和浓度分别用Agilent 2100(Agilent Technologies, CA)和NanoDrop 8000(NanoDrop, 美国)紫外分光光度仪进行检测。

### 1.3 cDNA文库的构建和测序

RNA-Seq文库的制备及测序是由上海派森诺生物科技有限公司完成, 将对照及处理组各9条样品鱼的肠、肾组织各自混合后, 提取样品总RNA。每个处理组肠和肾的等量总RNA混合, 再用DNase I消化DNA后, 用带有Oligo(dT)的磁珠富集样品总RNA中的mRNA。然后加入fragmentation buffer将mRNA打断成短片段, 以mRNA为模板, 用六碱基随机引物合成第一条cDNA链, 然后加入缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA polymerase I合成第二条cDNA链, 并使用试剂盒纯化回收、粘性末端修复、cDNA的3'末端加上碱基“A”并连接接头, 然后进行片段大小选择, 最后进行PCR扩增, 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 HiSeq™ 2000进行测序。

### 1.4 序列组装及注释

测序得到的reads, 并不都是有效的。里面含有带接头的、重复的、测序质量很低的reads, 这些reads会影响组装和后续分析, 我们对下机的reads过滤, 得到clean reads, 后续分析都基于此clean reads。数据处理的步骤: ①去除含adaptor的reads; ②去除N的比例大于5%的reads; ③去除低质量reads(质量值Q≤10的碱基数占整个reads的20%以上); ④获得Clean reads, 即原始序列数据经过去除杂质后得到的数据。我们使用短reads组装软件Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>)做转录组从头组装。Trinity首先将具有一定长度overlap的reads连成更长的片段, 这些通过reads overlap关系得到的不含N的组装片段作为组装出来的Unigenes。将Unigenes序列与蛋白数据库Nr、Swiss-Prot、KEGG和COG做blastx比对

( $E$ -value<0.000 01), 取比对结果最好的蛋白确定 unigenes 的序列方向, 得到与给定 unigenes 具有最高序列相似性的蛋白, 从而得到该 unigenes 的蛋白功能注释信息。根据 Nr 注释信息, 使用 Blast2GO (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) 得到 unigenes 的 GO 注释信息, 得到每个 unigenes 的 GO 注释后, 用 WEGO ([wego.genomics.org.cn](http://wego.genomics.org.cn)) 软件对所有 unigenes 做 GO 功能分类统计, 从宏观上认识该物种的基因功能分布特征。

### 1.5 预测编码蛋白框

CDS (coding sequence) 序列即编码序列, 一个 cDNA 序列被称为一个转录子, 第一个碱基所在的位置为转录起始位点 (TSS), cDNA 都是由外显子组成, 但编码蛋白质的外显子只有一个, 即 CDS, 这段序列就是一个开放阅读框 (open reading frame, ORF), 也是这个 cDNA 的 ORF 序列。ORF 的识别是证明一个新的 DNA 序列为特定的蛋白质编码基因的部分或全部的先决条件。为黄颡鱼蛋白分析和蛋白表达提供了丰富的信息资源。按 Nr、Swiss-Prot、KEGG 和 COG 的优先级顺序将 unigene 序列与以上蛋白库做 blastx 比对 ( $E$ -value<0.000 01), 如果某个 Unigene 序列比对上高优先级数据库中的蛋白, 则不进入下一轮比对, 否则自动跟下一个库做比对, 如此循环直到与所有蛋白库比对完。取 blast 比对结果中 rank 最高的蛋白确定该 unigene 的编码区序列, 然后根据标准密码子表将编码区序列翻译成氨基酸序列, 从而得到该 unigene 编码区的核酸序列 (序列方向 5'-3') 和氨基酸序列。最后, 与以上蛋白库皆比对不

上的 unigene 我们用软件 ESTScan (<http://www.ch.embnet.org/software/ESTScan2.html>) 预测其编码区, 得到其编码区的核酸序列 (序列方向 5'-3') 和氨基酸序列。

### 1.6 统计 SSR

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 又称微卫星 DNA, 指的是基因组中由 1~6 个核苷酸组成的基本单位重复多次构成的一段 DNA, 广泛分布于基因组的不同位置, 长度一般在 200 bp 以下, 其两端的序列高度保守, 可设计引物进行 PCR 扩增, 揭示其多态性。使用软件 MISA (MicroS Atellite) (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/misa.html>), 来找出所有的 SSRs。

## 2 结果

### 2.1 转录组测序及组装

利用 Illumina HiSeq™ 2000 进行测序, 得到 Total reads 305 568 982 条, 核苷酸 30 556 898 200 个。使用组装软件 Trinity 将短 reads 从头组装, 得到 unigene 83 265 个, 其中最长为 15 469 nt, 最短为 201 nt, 平均长度为 845.38 nt,  $N_{50}$  为 1620 nt。所有 unigene 均大于 200 nt, 长度在 200~300 nt 的 unigene 最多, 约为 33% (图 1)。长度超过 1000 nt 的占 24%, 所有 unigene 总长度为 70 390 671 nt。由组装序列长度可知, 此次测序质量良好, 进一步拼接结果较为理想。

### 2.2 转录组功能注释

首先, 通过 blastx 将 unigene 序列比对到蛋白

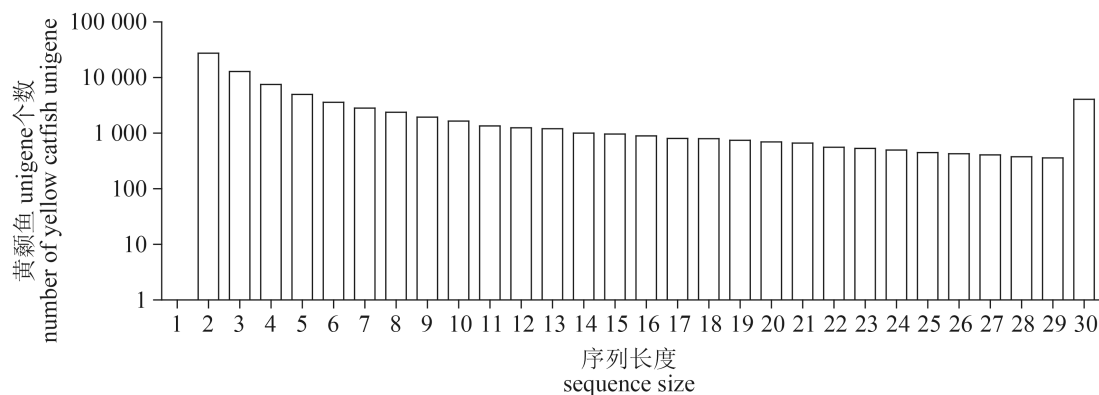


图 1 黄颡鱼 unigene 长度分布图

Fig. 1 Length distribution of *P. fulvidraco* unigene

1-30:<200, 200-299, 300-399, 400-499, 500-599, 600-699, 700-799, 800-899, 900-999, 1000-1099, 1100-1199, 1200-1299, 1300-1399, 1400-1499, 1500-1599, 1600-1699, 1700-1799, 1800-1899, 1900-1999, 2000-2099, 2100-2199, 2200-2299, 2300-2399, 2400-2499, 2500-2599, 2600-2699, 2700-2799, 2800-2899, 2900-2999, ≥3000

数据库Nr、SwissProt、KEGG和COG(E-value<0.000 01), 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共29 224条, 对比到Nr、SwissProt、KEGG和COG分别为29 191、24 761、14 291、7813条。其中对比到Nr蛋白库的占99.88%, 比值相当可观, E-value小于1e-100的占64.81%, 可见比对结果较为可信(图2)。同源序列比对最高的物种为斑马鱼(*Danio rerio*), 其次为斑马宫丽鱼(*Maylandia zebra*)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)等(图3)。

根据Nr蛋白质注释进行GO (gene ontology) 分析, GO总共有3个ontology, 分别描述基因的功能分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular

component)、参与的生物过程(biological process), 它是一个国际化的基因功能分类体系, 提供了一套动态更新的标准词汇表来全面描述生物体中基因和基因产物的属性。此次通过对黄颡鱼转录组的unigene进行GO分析, 得到13 885条unigene有GO注释, 约占47.6%, 注释到cellular process上的基因最多, 为8730; 其次为metabolic process, biological regulation, 分别为6857、4230(图4), 涉及GD功能分类共26种, 其中除总体功能预测相关基因外, 转录及信号转导相关基因也都占据一定比例(图5)。

### 2.3 近缘模式生物同源基因CDS

通过blast比对得到的CDS的长度大于3000 nt

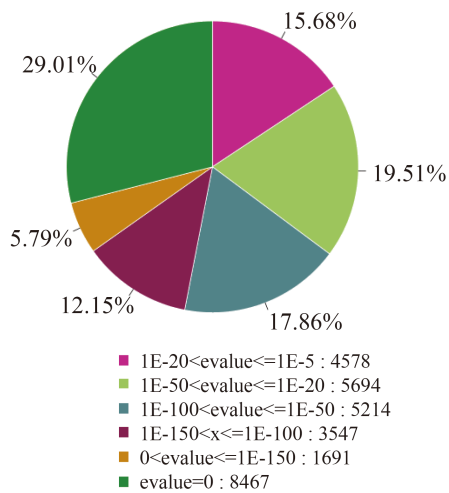


图2 unigene注释结果在Nr中的E值分布图

Fig. 2 Distribution of E-value in Nr

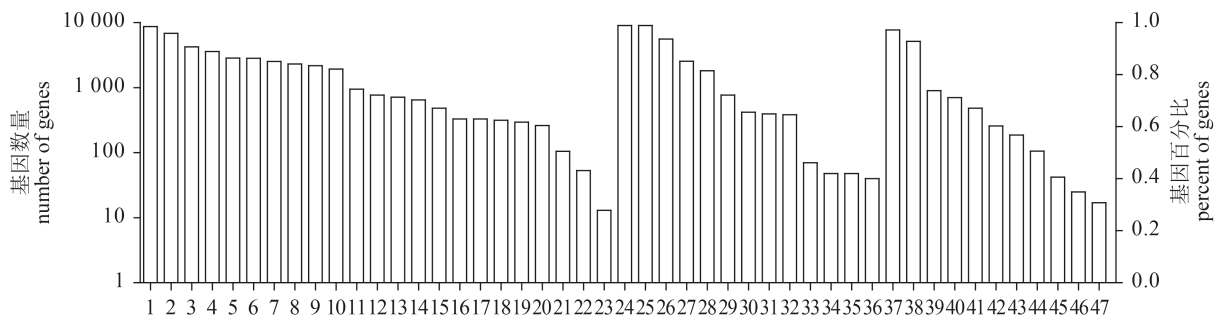


图4 unigenes的GO功能分类图

Fig. 4 GO class of unigenes

1-47: metabolic process, biological regulation, pigmentation, multicellular organismal process, localization, developmental process, establishment of localization, cellular component organization, response to stimulus, anatomical structure formation, cellular component biogenesis, immune system process, death, locomotion, biological adhesion, reproduction, reproductive process, growth, multi-organism process, viral reproduction, rhythmic process, cell killing, cell, cell part, organelle, organelle part, macromolecular complex, membrane-enclosed lumen, extracellular region, envelope, extracellular region part, synapse, virion part, virion, synapse part, binding, catalytic activity, transporter activity, molecular transducer activity, enzyme regulator activity, structural molecule activity, transcription regulator activity, translation regulator activity, auxiliary transport protein activity, antioxidant activity, electron carrier activity

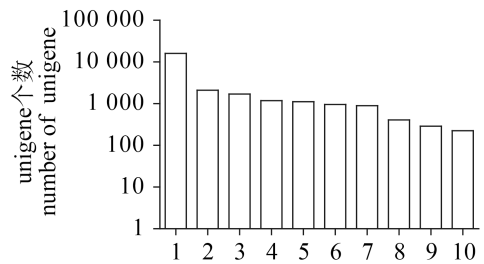


图3 物种分布统计(前十种)

1. 斑马鱼; 2. 斑马宫丽鱼; 3. 莫桑比克罗非鱼; 4. 斑点叉尾鲟; 5. 青鳉; 6. 大西洋鲑; 7. 红鳍东方鲀; 8. 长鳍叉尾鲟; 9. 海鲈; 10. 非洲爪蟾

Fig. 3 Distribution of species (top 10)

1. *Danio rerio*; 2. *Maylandia zebra*; 3. *Oreochromis mossambicus*; 4. *Ictalurus punctatus*; 5. *Oryzias latipes*; 6. *Salmon salar*; 7. *Takifugu rubripes*; 8. *Ictalurus furcatus*; 9. *Dicentrarchus labrax*; 10. *Xenopus tropica*

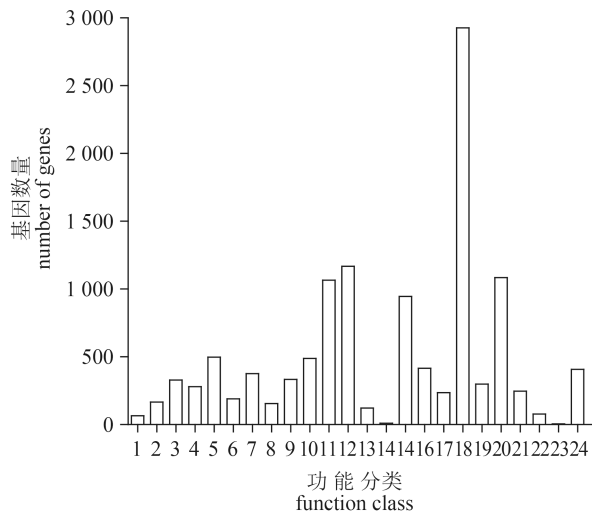


图5 unigenes的COG功能分类图

Fig. 5 COG function classification of unigenes

1-24: RNA processing and modification; Chromatin structure and dynamics; Energy production and conversion; Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; Amino acid transport and metabolism; Nucleotide transport and metabolism; Carbohydrate transport and metabolism; Coenzyme transport and metabolism; Lipid transport and metabolism; Translation, ribosomal structure and biogenesis; Transcription; Replication, recombination and repair; Cell wall/membrane/envelope biogenesis; Cell motility; Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; Inorganic ion transport and metabolism; Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; General function prediction only; Function unknown; Signal transduction mechanisms; Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; Defense mechanisms; Nuclear structure; Cytoskeleton;

的有1245条, 比对得到的CDS所翻译得到的氨基酸序列的长度大于3000 nt的是1245条; 通过ESTscan预测得到的CDS的长度大于500 nt的有21条, 通过ESTscan预测得到的CDS所翻译得到的氨基酸序列的长度大于500 nt的仅4条。

#### 2.4 SSRs预测

83 265条unigenes中鉴定出微卫星共21 063个, 其中包括二碱基、三碱基、四碱基、五碱基和六碱基重复, 各碱基重复数量分别为13 956、3847、2797、395和68个。

#### 2.5 不同维生素D<sub>3</sub>处理下基因的表达

实验将维生素D<sub>3</sub>对黄颡鱼小肠和肾脏基因表达的影响分为3个梯度, 即无添加、适量添加、高剂量添加。结果显示, 和零添加水平相比, 饲料中添加1243 IU/kg VD<sub>3</sub>的小肠和肾脏差

异表达基因共380个, 其中上调基因266个, 下调基因114个。和对照相比, 在饲料中添加1243 IU/kg VD<sub>3</sub>和22 700 IU/kg VD<sub>3</sub>同时出现差异表达的基因共有21个, 其中上调基因4个, 下调基因17个(表1)。根据FPKM将基因表达量分为4个等级, 低表达基因(0~1)、中表达基因(1~5)、较高表达基因(5~50), 高表达基因(50~500), 超高表达基因(>500)。结果显示, 当饲料中添加1243 IU/kg VD<sub>3</sub>时, 上调基因中高表达基因约占1.1%, 超高表达基因约占0.7%; 下调基因中高表达基因约占1.7%, 无超高表达基因。当饲料中添加22 700 IU/kg VD<sub>3</sub>时, 上调基因中高表达基因约占0.4%, 超高表达基因约占0.4%; 而下调基因中高表达基因约占2.6%(表2)。

表1 黄颡鱼饲料中添加不同水平VD<sub>3</sub>基因表达情况

Tab. 1 The gene regulation under different dietary VD<sub>3</sub> level treatment in yellow catfish

	饲料中添加VD <sub>3</sub> 浓度/(IU/kg) dietary VD <sub>3</sub> addition level		
	0	1243	22 700
共同上调基因/个 common up-regulated gene		266	4
共同下调基因/个 common down-regulated gene		114	17
共同调控基因总计/个 total common regulated gene		380	21

表2 黄颡鱼饲料中添加不同水平VD<sub>3</sub>共同调控基因比重分布

Tab. 2 The proportion of common regulated genes under different dietary VD<sub>3</sub> level treatments/ in yellow catfish

	表达量 FPKM	饲料中添加VD <sub>3</sub> 浓度/(IU/kg) dietary VD <sub>3</sub> addition level		
		0	1243	22 700
共同上调基因占百分比/% the percentage of the common up-regulated gene	0~1		14.7	32.4
	1~5		53.7	57.5
	5~50		29.7	9.4
	50~500		1.1	0.4
	>500		0.7	0.4
共同下调基因占百分比/% the percentage of the common up-regulated gene	0~1		54.4	51.8
	1~5		20.2	21.0
	5~50		23.7	24.6
	50~500		1.7	2.6
	>500		0.0	0.0

### 3 讨论

2011年,第二代高通量测序技术全面替代第一代测序技术,这种测序技术不仅具备多种优点,更克服了先前测序技术的许多局限<sup>[15-16]</sup>,迎来了高通量测序前所未有的狂潮。该技术在哺乳动物<sup>[17-18]</sup>、农作物<sup>[19-22]</sup>中研究较广,在水产动物研究中相对较少。Daniel等<sup>[23]</sup>对C57BL/6J和DBA/2J型小鼠纹状体的基因表达情况进行了研究,Wang等<sup>[24]</sup>对于鸡肺部的转录组进行了数据分析及概括,Li等<sup>[25]</sup>表示RNA-seq技术可提高黄爪的蛋白注释量,Jeffrey等<sup>[26]</sup>利用RNA-seq技术顺利找出植物致病菌。近几年来,RNA-seq技术在水产动物中的应用也显著增加,此项技术对于鱼类疾病、免疫、生长、抗逆、系统进化和生物毒理过程及机理等方面的研究都有极大的帮助<sup>[8]</sup>。Pallavi等<sup>[27]</sup>在鲤锚头蚤(*Lernaea cyprinacea*)寄生病的相关基因推测研究中就利用了转录组测序技术,Li等<sup>[28]</sup>在鲤(*Cyprinus carpio*)肾脏转录组分析中为鲤免疫系统及防御机制的研究提供了大量有用信息;Wang等<sup>[29]</sup>进行了达里湖高原鳅(*Triplophysa dalaica*)低氧研究;Tian等<sup>[30]</sup>对于饲喂鱼油和猪油的草鱼肝脏转录组测序,通过不同能量代谢及生长调控相关基因,从分子层面上表现了鱼油在饲料中的重要性;Deng等<sup>[31]</sup>研究饲料原料替代对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长性能、抗氧化能力、免疫反应等的影响。Shen等<sup>[32]</sup>对长江凤鲚(*Coilia ectenes*)转录组的深入分析丰富了鲚属的数据库。Zhang等<sup>[33]</sup>研究了半滑舌鳎(*Cynoglossus semilaevis*)在感染弧菌病毒后相关免疫基因的表达变化。Lu等<sup>[34-35]</sup>利用转录组技术对黄颡鱼性别决定基因及个别基因的两性差异表达进行了探索。为了尽可能完整、系统地获得饲料VD<sub>3</sub>对黄颡鱼小肠和肾脏影响的转录组数据信息,本实验选取了3个不同浓度梯度的处理,分别代表了零添加水平、中等添加水平和高添加水平。转录组分析发现,和零添加水平相比,中等添加水平处理组小肠和肾脏差异表达基因共380个,其中上调基因266个,下调基因114个。和对照相比,在中等添加水平和高添加水平中同时出现差异表达的基因共有21个,其中上调基因4个,下调基因17个。这些差异表达基因中包含SLC(solute carrier)家族基因6种:SLC family5、SLC family7、SLC family24、SLC family35、SLC family37、SLC

family41。SLC即溶质运载蛋白,涵盖了55个家族不少于362个功能性编码蛋白基因,如转运蛋白、协同转运蛋白、逆向转运蛋白等,其功能性表现在对氨基酸和寡肽的转运;无机阴阳离子的转运;葡萄糖等其他糖类的转运;金属离子的转运、胆汁盐和有机阴离子的转运;尿素、神经传导物质、生物胺、铵盐、胆碱的转运;脂肪酸、前列腺素、类固醇硫酸盐的转运;维生素、辅酶因子的转运;核苷酸的转运<sup>[36]</sup>。其中SLC family7基因主要转运阳离子氨基酸及与糖蛋白相关氨基酸,本实验发现,当饲料中添加1243 IU/kg VD<sub>3</sub>时,该基因表达量显著上调,FPKM值达到了约26.16,而当饲料中添加22 700 IU/kg VD<sub>3</sub>时,该基因表达量下降,表明饲料中VD<sub>3</sub>的水平对营养物质的吸收转运起着非常重要的作用,饲料中过多添加VD<sub>3</sub>,可能会对相关转运蛋白基因产生负反馈调节,从而降低鱼体对氨基酸的吸收。有研究显示<sup>[37]</sup>,饲料中添加4000 IU/Kg的VD<sub>3</sub>时,黄颡鱼的细胞凋亡数显著高于对照组;段鸣鸣等<sup>[5]</sup>发现,饲料中添加22 700 IU/kg VD<sub>3</sub>和1243 IU/kg VD<sub>3</sub>相比,黄颡鱼幼鱼肝脏的受损程度显著加深。因此我们推断过量的VD<sub>3</sub>会对黄颡鱼的代谢与发育带来不利影响。

在本实验中,未得到注释的基因高达54 041个,其主要原因可能是由于黄颡鱼的转录组数据还相对较少,没有比较可靠的参考数据库。

通过对黄颡鱼转录组的unigene进行GO功能分类,得到有GO注释unigenes 13 885条,约占47.6%,注释到细胞过程(cellular process)上的基因最多,为8730,其次为代谢过程(metabolic process)、生物调节(biological regulation),分别为6857、4230。KEGG pathway富集分析中,共涉及240条不同通路,包括:物质代谢信号通路、钙合成转运信号通路、信号转导信号通路等。其中涉及代谢通路相关基因数量最多,达到1532个,占10.72%。其次是癌症通路和MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)信号通路,涉及基因数量分别为649个、542个,分别占4.54%、3.79%。可以看出在KEGG pathway富集分析和GO功能分类分析中代谢调控和癌症通路都占据了相当大的比例,这可能与维生素D的旁分泌和自分泌功能有关。维生素D的旁分泌和自分泌功能依赖于表达有核维生素D受体(VDR)的不同细胞独特的基因转录调节功能,作用于抑制细胞增殖,促进细胞分

化和凋亡<sup>[38]</sup>。维生素D在人类医学上的研究被证实具有调节先天及适应性免疫系统的功能<sup>[39]</sup>。研究显示, 在抵御流感病毒时, 补充维生素D比抗病毒药物和疫苗更有效<sup>[40]</sup>。在本转录组数据库中, 我们发现了众多和免疫相关的差异表达基因, 如肠道黏蛋白基因、干扰素诱导基因、toll样受体等, 暗示饲料中添加VD<sub>3</sub>对黄颡鱼相关免疫基因可能具有一定调节作用, 这还需要进一步通过实验进行验证。

本实验发现, 饲料维生素D<sub>3</sub>水平影响了Ko0978通路中相关基因的表达。该通路与Na、P转运相关。其中SLC family34成员Na/Pi-IIb基因是鱼类主动吸收无机磷的一个关键转运载体基因, Chen等<sup>[41]</sup>已经获得黄颡鱼小肠Na/Pi-IIb的相关基因序列。通过本实验的转录组差异基因分析发现, 饲料维生素D<sub>3</sub>水平影响了该转运载体基因的表达, 证实了鱼类对磷的吸收受饲料维生素D<sub>3</sub>水平的影响。

#### 4 结论

利用第二代测序RNA-seq技术对饲料中添加不同水平维生素D<sub>3</sub>的黄颡鱼进行了小肠和肾脏转录组测序, 得到unigene 83 265个, 功能注释基因29 224个, 比对到Nr蛋白数据库的高达99.88%。本研究为黄颡鱼基因组学和蛋白质组学研究提供了资料, 同时也为进一步研究饲料维生素D<sub>3</sub>对黄颡鱼营养免疫分子机制奠定了良好的基础。

#### 参考文献:

- [1] Yoshiaki Y, Yoshikazu F, Nishioka T, *et al.* Structural evidence for enhancement of sequential vitamin D<sub>3</sub> hydroxylation activities by directed evolution of cytochrome P450 vitamin D<sub>3</sub> hydroxylase[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(41): 31193-31201.
- [2] 张桐, 徐奇友, 许红, 等. 饲料中维生素D<sub>3</sub>对松浦镜鲤幼鱼体成分和血清碱性磷酸酶的影响[J]. *华北农学报*, 2011, 26(增刊1): 258-263.
- Zhang T, XU Q Y, Xu H, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> supplementation on body composition and activity of alkaline phosphatase in the serum of juvenile mirror carp (*C. carpio Songpu mirror carp*)[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2011, 26(suppl. 1): 258-263(in Chinese).
- [3] 张桐. 饲料中添加不同水平维生素D<sub>3</sub>对松浦镜鲤幼鱼影响的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2011.
- Zhang Tong. The study on effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> supplementation of juvenile mirror carp (*C. carpio Songpu mirror carp*)[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2011(in Chinese).
- [4] 蒋明, 吴凡, 文华, 等. 饲料中添加不同水平的维生素D<sub>3</sub>对草鱼幼鱼生长和体成分的影响[J]. *淡水渔业*, 2009, 39(5): 38-42.
- Jiang M, Wu F, Wen H, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> supplementation on growth and body composition of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)[J]. *Freshwater Fisheries*, 2009, 39(5): 38-42(in Chinese).
- [5] 段鸣鸣, 王春芳, 谢从新. 维生素D<sub>3</sub>对黄颡鱼幼鱼抗氧化能力及免疫功能的影响[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(3): 80-84.
- Duan M M, Wang C F, Xie C X. Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> on antioxidant and immune capacity of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(3): 80-84(in Chinese).
- [6] 黎德兵, 李超, 张龚炜, 等. 饲料中维生素D<sub>3</sub>水平对黄颡抗菌肽hepcidin基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(8): 1520-1526.
- Li D B, Li C, Zhang G W, *et al.* Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> level on expression of antimicrobial peptide hepcidin gene in *Monopterus albus*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(8): 1520-1526(in Chinese).
- [7] Chen X, Mei J, Wun J J, *et al.* A comprehensive transcriptome provides candidate genes for sex determination/differentiation and SSR/SNP markers in yellow catfish[J]. *Mar Biotechnol*, 17(2): 190-198.
- [8] 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.
- Luo H, Ye H, Xiao S H, *et al.* Application of transcriptomics technology to aquatic animal research[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(4): 598-607(in Chinese).
- [9] 张春兰, 秦孜娟, 王桂芝, 等. 转录组与RNA-Seq技术[J]. *生物技术通报*, 2012, 12: 51-56.
- Zhang C L, Qin Z J, Wang G Z, *et al.* Transcriptome and RNA-Seq technology[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2012,

- 12: 51-56(in Chinese).
- [10] 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 (Beijing), 2011, 33(11): 1191-1202(in Chinese).
- [11] Shi M J, Huang R, Du F K, *et al.* RNA-seq profiles from grass carp tissues after reovirus (GCRV) infection based on singular and modular enrichment analyses[J]. Molecular Immunology, 2014, 61(1): 44-53.
- [12] 刘凯, 谢楠, 冯晓宇, 等. 基于RNA-seq技术对乌鳢和斑鳢肝脏的转录组分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 557-559.
- Liu K, Xie N, Feng X Y, *et al.* Transcriptome analysis of livers in *Channa argus* and *Channa maculatus* based on RNA-Seq technique[J]. Journal of Dalina Ocean University, 2014, 29(6): 557-559(in Chinese).
- [13] Ribas L, Pardo B G, Fernandez c, *et al.* A combined strategy involving Sanger and 454 pyrosequencing increases genomic resources to aid in the management of reproduction, disease control and genetic selection in the turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 180-200.
- [14] 许建, 赵建, 徐鸣礼, 等. 基于RNA-Seq技术的鲮转录组分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(6): 556-560.
- Xu J, Zhao J, Xu M L, *et al.* Transcriptome analysis of mud carp *Cirrhina molitorella* using RNA-Seq[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(6): 556-560(in Chinese).
- [15] 赵兴武, 袁晓初, 赵文武, 等. 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015: 30-31.
- Zhao X W, Yuan X C, Zhao W W, *et al.* China fishery statistical yearbook [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015: 30-31(in Chinese).
- [16] 梅步俊, 王志华. 转录组研究策略及RNA-Seq数据分析[J]. 河套学院学报, 2015, 12(2): 79-82.
- Mei B J, Wang Z H. Transcriptome research strategies and RNA-seq data analysis[J]. Journal of Hetao College, 2015, 12(2): 79-82(in Chinese).
- [17] 付言峰, 周艳红, 王爱国, 等. 梅山猪胚胎附植期 *EphB2* 的组织表达及RNA-seq分析[J]. 遗传, 2014, 36(12): 1243-1248.
- Fu Y F, Zhou Y H, Wang A G, *et al.* Tissue expression of *EphB2* and RNA-seq analysis during embryo implantation in Meishan pigs[J]. Hereditas (Beijing), 2014, 36(12): 1243-1248(in Chinese).
- [18] 孟宪然, 杜琛, 王静, 等. 基于RNA-seq识别山羊肉品质候选基因[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(8): 1300-1307.
- Meng X R, Du C, Wang J, *et al.* RNA-Seq approach for identifying candidate genes of meat quality in goats[J]. Acta Veterinariae Zootechnica Sinica, 2015, 46(8): 1300-1307(in Chinese).
- [19] 陈小平, 洪彦彬, 张二华, 等. 高通量花生转录组分析系统的构建与应用[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(3): 235-241.
- Chen X P, Hong Y B, Zhang E H, *et al.* Construction and application of a high-throughput analysis system for peanut transcriptome[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences. 2011, 33(3): 235-241(in Chinese).
- [20] 魏利斌, 苗红梅, 张海洋. 芝麻发育转录组分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(7): 1246-1256.
- Wei L B, Miao H M, Zhang H Y. Transcriptomic analysis of sesame development[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(7): 1246-1256(in Chinese).
- [21] 陈嘉贝, 张芙蓉, 黄丹枫, 等. 盐胁迫下两个甜瓜品种转录因子的转录组分析[J]. 植物生理学报, 2014, 50(2): 150-158.
- Chen J B, Zhang F R, Huang D F, *et al.* Transcriptome analysis of transcription factors in two melon (*Cucumis melo* L.) cultivars under salt stress[J]. Plant Physiology Journal, 2014, 50(2): 150-158(in Chinese).
- [22] 李锡花, 吴嫒, 于霁雯, 等. 棉花纤维发育早期RNA-Seq转录组分析[J]. 棉花学报, 2013, 25(3): 189-196.
- Li X H, W M, Yu J J, *et al.* Transcriptome analysis of early developing cotton fiber by RNA-Seq[J]. Cotton Science, 2013, 25(3): 189-196. (in Chinese)
- [23] Daniel B, Nicole A. R. W, Jessica E H, *et al.* Evaluating gene expression in C57BL/6J and DBA/2J mouse striatum using RNA-Seq and microarrays[J]. PLoS ONE, 2011, 6(3).
- [24] Ying W, Noushin G, Charles D J, *et al.* Evaluation of the coverage and depth of transcriptome by RNA-Seq in chickens[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(Suppl 10): S5.
- [25] Li Z, Zhang Z H, Yan P H, *et al.* RNA-Seq improves annotation of protein-coding genes in the cucumber genome[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 540.



- [26] Jeffrey A K, Di Y M, Jason S C, *et al.* RNA-Seq for plant pathogenic bacteria[J]. *Genes*, 2011, 2(4): 689-705.
- [27] Pallavi.B, Hankar K M, Abhiman P B, *et al.* Identification of putative genes involved in parasitism in the anchor worm, *Lernaea cyprinacea* by *de novo* transcriptome analysis[J]. *Experimental Parasitology*, 2015, 153: 191-197.
- [28] Li G X, Zhao Y L, Liu Z H, *et al.* *De novo* assembly and characterization of the spleen transcriptome of common carp (*Cyprinus carpio*) using Illumina paired-end sequencing[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 420-429.
- [29] Wang Y, Yang L D, Wu B, *et al.* Transcriptome analysis of the plateau fish (*Triplophysa dalaica*): implications for adaptation to hypoxia in fishes[J]. *Gene*, 2015, 565(2): 211-220.
- [30] Tian J J, Lu R H, Ji H, *et al.* Comparative analysis of the hepatopancreas transcriptome of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) fed with lard oil and fish oil diets[J]. *Gene*, 2015, 565(2): 192-200.
- [31] Deng J M, Mai K S, Chen L Q, *et al.* Effects of replacing soybean meal with rubber seed meal on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to *Aeromonas hydrophila* in tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O.aureus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 436-444.
- [32] Shen H S, Gu R B, Xu G C, *et al.* In-depth transcriptome analysis of *Coilia ectenes*, an important fish resource in the Yangtze River: *de novo* assembly, gene annotation[J]. *Marine Genomics*, 2015, 23: 15-17.
- [33] Zhang X, Wang S L, Chen S L, *et al.* Transcriptome analysis revealed changes of multiple genes involved in immunity in *Cynoglossus semilaevis* during *Vibrio anguillarum* infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 43(1): 209-218.
- [34] Lu J G, Luan P X, Zhang X F, *et al.* Gonadal transcriptomic analysis of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): identification of sex-related genes and genetic markers[J]. *Physiol Genomics*, 2014, 46(21): 798-807.
- [35] Lu J G, Zheng M, Zheng J J, *et al.* Transcriptomic analyses reveal novel genes with sexually dimorphic expression in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) Brain[J]. *Mar Biotechnol*, 2015, 17(5): 613-623.
- [36] He L, Vasilou K, W. Nebert D. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily[J]. *Human Genomics*, 2009, 3(2): 195-206.
- [37] 黎德兵, 李超, 张龚炜, 等. 饲料中维生素D<sub>3</sub>添加水平对黄颡外周免疫相关组织细胞增殖和凋亡的影响[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(4): 752-760.
- Li D B, Li C, Zhang G W, *et al.* Effects of vitamin D<sub>3</sub> supplemental level on cell proliferation and apoptosis of peripheral immune related tissues in *Monopterus albus*[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(4): 752-760(in Chinese).
- [38] Mostafa W Z, Hegazy R A. Vitamin D and the skin: focus on a complex relationship: A review[J]. *Journal of Advanced Research*, 2015, 6(6): 793-804.
- [39] Calton E K, Keane K N, Newsholme P, *et al.* The impact of vitamin D levels on inflammatory status: A systematic review of immune cell studies[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0141770.
- [40] Torres M. Vitamin D proven more effective than both anti-viral drugs and vaccines at preventing the flu[J]. *Alternative Medicine, Functional Medicine*, 2015, 10: 19.
- [41] Chen P, Tang Q, Wang C F. Characterizing and evaluating the expression of the type IIb sodium-dependent phosphate cotransporter (*slc34a2*) gene and its potential influence on phosphorus utilization efficiency in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)[J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2015, 42(1): 51-64.

## Effects of dietary vitamin D<sub>3</sub> level on transcriptomic response in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

FENG Meihui, CHEN Pei, DUAN Mingming, WANG Chunfang\*

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, National Technology System for Conventional Freshwater Fish Industries, Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Key Laboratory of Freshwater Animal Breeding, Ministry of Agriculture, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** The study was carried out to investigate the effects on possible gene regulation in intestine and kidney of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) under the treatments of different dietary vitamin D<sub>3</sub> levels (0(VD0), 1243(VD2), 22 700(VD20) IU/Kg) by RNA-seq technique. 83 265 unigenes were selected from the 305 568 982 raw reads. The average length was 845.38 nt and N50 was 1620 nt. 29 224 genes were annotated by using Blast software. According to the results of gene ontology functional enrichment analysis, significant differently expressed genes were mainly distributed on the pathways like cellular process, metabolic pathways and biological regulation. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that 1532 genes were involved in metabolic pathway, in which the affected genes were the most. Dietary vitamin D treatment significantly affected the genes expression. When compared with the control group (VD0 vs VD2/VD0 vs VD20), 380 genes were up- and down-regulated in common, in which 266 genes were up-regulated and 114 genes were down-regulated. Among three levels (VD0 vs VD2 vs VD20), 21 genes were up- and down-regulated in common, including 4 genes up-regulated and 17 down-regulated. The results indicated that different dietary vitamin D<sub>3</sub> levels significantly affected the gene expressions in intestine and kidney of yellow catfish. The information of the differentially expressed genes provided evidences about the growth, metabolism and immunological response of yellow catfish.

**Key words:** *Pelteobagrus fulvidraco*; vitamin D<sub>3</sub>; transcriptomic analysis; gene expression

**Corresponding author:** WANG Chunfang. E-mail: cfwang@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Nature Science Foundation of China (31172421)