

文章编号: 1000-0615(2017)11-1667-13

DOI: 10.11964/jfc.20161010568

## 正常与性早熟中华绒螯蟹的Y-器官转录组分析

张佳鑫, 徐敏杰, 黄根勇,  
张聪, 杨志刚, 成永旭, 杨筱珍\*

(上海海洋大学农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海水产养殖工程技术研究中心,  
上海海洋大学水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

**摘要:** 性早熟是中华绒螯蟹养殖过程中普遍存在的一个问题。为发掘中华绒螯蟹性早熟相关的重要功能基因, 实验采用Illumina Hiseq 2000高通量测序技术获得了正常与性早熟雌蟹的Y-器官转录组数据, 并进行比较分析。结果显示, 测序分别获得44 619 538和43 052 958个clean reads, 比对发现2655个差异表达基因, Gene Ontology (GO)功能分类分析将文库中的差异表达基因归类到3大功能(生物过程、细胞组分和分子功能)的42个类别中。KEGG富集分析将文库中的差异表达基因富集到134条特定的KEGG代谢途径, 其中4条是显著性富集, 包括酮体合成和降解、丁酸甲酯代谢、神经营养因子信号通路和碱基切除修复通路。通过RNA-seq技术获得了丰富的中华绒螯蟹Y-器官转录组信息, 为中华绒螯蟹新基因克隆、性早熟成因与预防和Y-器官的研究提供有价值的信息。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 性早熟; Y-器官; 转录组

**中图分类号:** Q 785; S 917.4

**文献标志码:** A

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*), 又称河蟹、毛蟹、清水蟹、大闸蟹, 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、软甲纲(Malacostraca)、十足目(Decapoda)、方蟹科(Grapsidae)、绒螯蟹属(*Eriocheir*), 主要分布在我国南北沿海各地湖泊、河流中。河蟹味道鲜美, 营养丰富, 是我国特有的名优水产品, 具有较高的经济价值。性早熟是河蟹培育过程中普遍出现的现象, 据统计, 长江流域自然水体当年蟹性早熟率为5%~10%, 而人工饲养条件下若条件适宜, 河蟹当年性早熟率可高达20%~98%<sup>[1]</sup>。这些性早熟当年蟹完成青春蜕壳后, 在第二年4—5月会因蜕壳不遂大量死亡, 严重制约着河蟹养殖产量和品质。

对河蟹性早熟成因的研究多集中在养殖环境、饲料营养和生理生化等方面, 将性早熟发生的众多因素分为外在和内在两方面。外在因素有温度、光照、盐度、pH和营养过剩等<sup>[2-3]</sup>,

而内在因素包括种质差异和内分泌影响等。现已证明甲壳动物有多种内分泌腺体, 包括X-器官-窦腺复合体、Y-器官、大颚器、脑胸神经节、促雄性腺、性腺等。这些腺体分泌的激素相互协调调控着甲壳动物的新陈代谢、生长发育、蜕皮和生殖等重要生理活动。河蟹性早熟表现为性腺提早发育成熟、生长发育延缓、蜕皮次数减少, 而整个蜕皮过程受到Y-器官分泌的蜕皮酮控制。Y-器官作为甲壳动物重要的内分泌器官, 因其体积较小、色淡, 与周围组织很难区分导致取样困难, 对这一器官功能调控的精细研究较为少见, 对其分子水平的研究更为缺乏。根据河蟹的第三颚足外肢末端形态特征, 将河蟹的生长过程大致分为: 蜕皮间期、蜕皮前期、蜕皮和蜕皮后期这四个时期<sup>[4-5]</sup>。而在不同的蜕皮时期内Y-器官的结构形态和功能存在周期性变化<sup>[6]</sup>。其中蜕皮间期是河蟹持续时

收稿日期: 2016-10-08 修回日期: 2017-01-25

资助项目: 国家自然科学基金(31272677; 31472287); 上海市科技兴农推广项目[沪农科推字(2015)第1-7号]; 上海市科委项目(16DZ2281200); 现代农业产业技术体系专项

通信作者: 杨筱珍, E-mail: xzyang@shou.edu.cn

间最长、数量最多,同时也是最活跃且活动最稳定的时期,因此本实验选取蜕壳间期的河蟹作为实验材料。

新的RNA-seq技术已经大幅度提高了人们对非模式物种进行转录组分析的能力,转录组测序开拓了生物功能研究的新领域,对机制的分析研究产生了巨大的影响<sup>[7-8]</sup>。在NCBI-SRA数据库中有大量不同物种的转录组原始数据,其中包括河蟹肝胰腺、精巢和副性腺、血淋巴、促雄性腺、眼柄等组织转录组信息,涉及河蟹胚胎发育、群体基因组学、免疫、渗透压、雌雄差异等方面的研究。但尚未有关于正常与性早熟河蟹的Y-器官转录组比较的报道。本实验使用RNA-seq技术对正常与性早熟雌性河蟹的Y-器官进行转录组测序,为后续克隆、Y-器官功能研究和早熟内在机制研究等奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 Y-器官解剖定位

Y-器官在不同的甲壳动物体内形态不尽相同,且位置也有所差异。参考赵维信等<sup>[6]</sup>人对河蟹Y-器官解剖位置的描述,采集的Y-器官经常规石蜡切片H.E染色后,在显微镜下观察进行鉴定和组织定位,以确保后续实验所采集Y-器官的准确性。

### 1.2 样本采集

于2015年4月22—23日期间选取饲养于上海海洋大学崇明基地室外环境下同一池塘养殖健康的处于蜕壳间期的正常和性早熟雌蟹,每组6只。其中正常雌蟹腹部肚脐为半圆形,脐周围无绒毛(图版I-1);打开头胸甲后可以看到卵巢未发育(图版I-3)。而早熟雌蟹腹部肚脐已近似圆

形,脐周围长有绒毛(图版I-2);打开头胸甲后可以看到紫色的卵巢(图版I-4)。正常幼蟹体质量(8.89±2.01)g,甲壳长(24.35±1.64)mm,甲壳宽(26.03±1.89)mm;性早熟蟹体质量(20.56±4.53)g,甲壳长(33.01±2.46)mm,甲壳宽(34.20±2.64)mm。外部相关性状测量后,用灭菌的镊子和剪刀取河蟹的Y-器官,迅速置于去RNA酶的1.5 mL的离心管中,并放于液氮中后转入-80 °C冰箱中保存备用。

### 1.3 RNA提取以及转录组测序文库的构建

测序实验采用Illumina Truseq™ RNA sample prep Kit方法进行文库构建(表1)。

将6只正常幼蟹和6只性早熟蟹的Y-器官分别混合,参照RNAiso™Plus (TaKaRa)操作说明书进行总RNA的提取,利用Nanodrop 2000对所提RNA的浓度和纯度进行检测,琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,Agilent 2100测定RIN值。单次建库要求RNA总量5 μg,浓度≥200 ng/μL, OD<sub>260/280</sub>介于1.8~2.2。

利用带有Oligo (dT)的磁珠与polyA进行A-T碱基配对,从总RNA中分离出mRNA。加入fragmentation buffer,可以将富集得到的mRNA(完整的RNA序列)随机断裂成200 bp左右的小片段。在逆转录酶的作用下,利用随机引物(random hexamers),以mRNA为模板反转合成一链cDNA,随后进行二链合成,形成稳定的双链结构。双链的cDNA结构为粘性末端,加入End Repair Mix将其补成平末端,随后在3'末端加上一个碱基A,用于连接Y字形的接头。PCR扩增15个循环进行文库富集;用2%琼脂糖胶回收目的条带(Certified Low Range Ultra Agarose);TBS380(Picogreen)定量,按数据比例混合上机;cBot上进行桥式PCR

表 1 试剂仪器表

Tab. 1 The table of reagent and instrument

实验步骤 experimental procedure	试剂仪器名称 reagent and instrument	厂商 manufacturer
mRNA分离 mRNA isolation	磁力架	Invitrogen
建库 library construction	Truseq™ RNA sample prep Kit	Illumina
定量 quantity	TBS380 Picogreen	Invitrogen
文库回收 recovery	Certified Low Range Ultra Agarose	Bio-Rad
桥式扩增 bridge amplification	cBot Truseq PE Cluster Kit v3-cBot-HS	Illumina
上机测序 sequence	Hiseq2000 Truseq SBS Kit v3-HS (200cycles)	Illumina

扩增, 生成clusters; 最后进行IlluminaHiseq测序。

目的样品的转录组测序建库由上海美吉生物医药科技有限公司完成。采用Illumina Hiseq 2000测序平台完成转录组测序, 构建Illumina PE文库(200 bp)进行2×151 bp测序, 对获得的测序数据进行质量控制, 之后利用生物信息学手段对转录组数据进行分析。

#### 1.4 原始数据的过滤与转录组拼接

使用SeqPrep和Sickle软件对原始测序数据进行过滤, 从而得到高质量的测序数据(clean data)以保证后续分析的顺利进行, 具体步骤: ① 去除reads中的接头序列, 去除由于接头自连等原因导致没有插入片段的reads; ② 将序列末端(3'端)低质量(质量值小于20)的碱基修剪掉, 如剩余序列中仍然有质量值小于10则将整条序列剔除, 否则保留; ③ 去除含N比率超过10%的reads; ④ 舍去adapter及质量修剪后长度小于30 bp的序列。由于河蟹无参考基因组, 获得RNA-seq高质量测序数据后, 采用Trinity软件<sup>[9]</sup>(<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>, 版本号: trinityrnaseq\_r20140413)将所有测序读段通过从头组装生成重叠群和单一序列。此项分析是后续处理及生物学功能分析的基础。

#### 1.5 组装后转录组注释

利用Trinity软件提供的ORF预测程序对组装得到的所有转录本序列进行开放阅读框预测。通过HMMER 3.0程序对组装出来的转录本进行蛋白质注释; 将拼接所得所有核苷酸序列使用软件Blast2GO进行GO注释; 使用BlastX 2.2.25<sup>[10]</sup>分别与NR、String、Swissprot、KEGG数据库进行比对获得相应的注释信息。期望值E value<1e-5。

#### 1.6 表达量分析和表达差异分析

使用短序列比对软件Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>)可将测序得到的clean reads对应到组装得到的转录组上。使用软件RSEM (<http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/>)将bowtie的比对结果进行表达量统计, 首先得到每个样品比对到每个基因上的read count数目, 然后对其进行FPKM转换, 进而得到基因的表达水平。使用软件edgeR (<http://www.bioconductor.org/packages/2.12/bioc/html/edgeR.html>)将由RSEM软件

得到的gene read count数据进行差异表达计算。该分析方法是基于负二项分布模型。本次项目中, 显著差异表达基因的筛选标准为FDR<0.05,  $\log_2|FC| \geq 1$ 。

## 2 结果

### 2.1 Y-器官解剖定位

河蟹Y-器官位于前腮腔, 大颚外侧, 内收肌腹缘, 靠近头胸甲内侧上皮附近, 在体内左右各1个, 呈淡黄色, 椭圆形球体, 体积较小(图版II-1、2、3)。

经H.E染色后光镜观察, 明显可见细胞核着色, 胞质较少的, 细胞密集分布的组织, 此即为Y-器官的实质部。密集细胞间呈条索状, 且有少量血窦分布(图版II-4)。

### 2.2 转录组拼接和注释

正常与性早熟河蟹的Y-器官测序共获得了原始数据13 355 274 300 bp, 去除原始序列中的低质量、短序列和接头序列后, 分别获得44 619 538和43 052 958条序列, 数据量分别为6.26 GB和6.08 GB, GC含量分别为45.49%和46.12%。利用Trinity软件对所有clean data进行从头组装后获得了139 388个转录本, 其中116 781个unigenes, 平均长度为602.9 bp(图1)。其中10 619, 4168, 11 735, 8309, 19 138个unigenes分别被Pfam, KEGG, Swissprot, String, NR数据库注释, 这可以帮助我们了解unigene序列信息。

### 2.3 表达差异分析

正常与性早熟河蟹的Y-器官组织比较转录组差异表达分析共鉴定出了2655个差异表达基因, 其中1333个基因在性早熟蟹中高表达, 1322个基因低表达。

**差异表达基因GO功能分类** 利用GO数据库, 可以将差异基因按照它们参与的生物学过程、构成细胞的组分、实现的分子功能等进行分类统计。以正常幼蟹的转录组样本为对照, 上下调基因GO注释可归类到3大本体的42个类别中(图2)。结果显示, 生物过程一类中, 与生物调节(biological regulation)、细胞过程(cellular process)、代谢过程(metabolic process)、生物过程的调控(regulation of biological process)和单生物过程(single-organism process)相关的基因富集较多; 在细胞组分一类中, 与细胞(cell)、细胞部分(cell

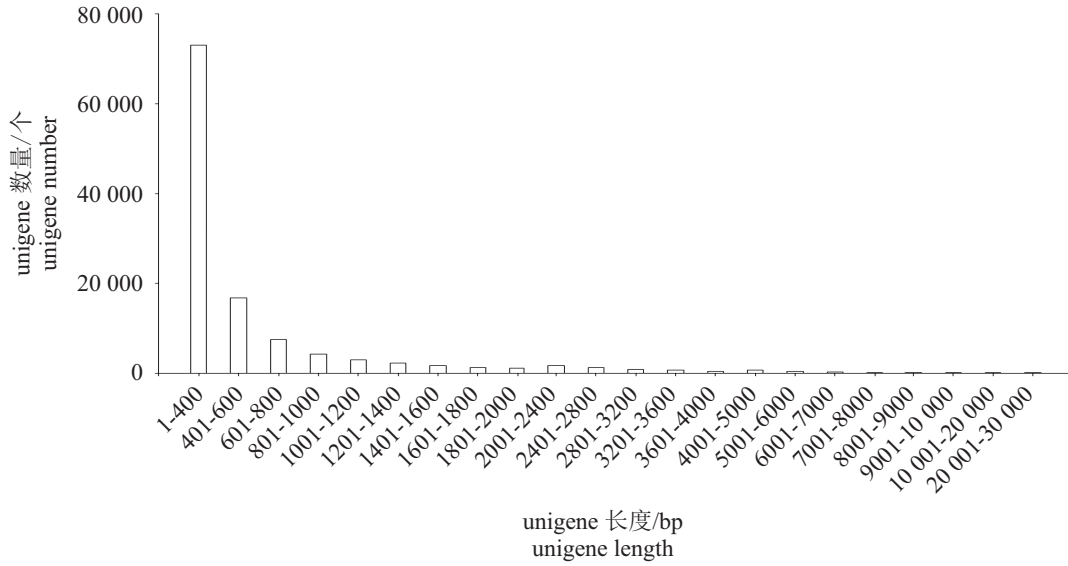


图 1 转录组unigene长度分布图

Fig. 1 Distribution of transcriptome contig length

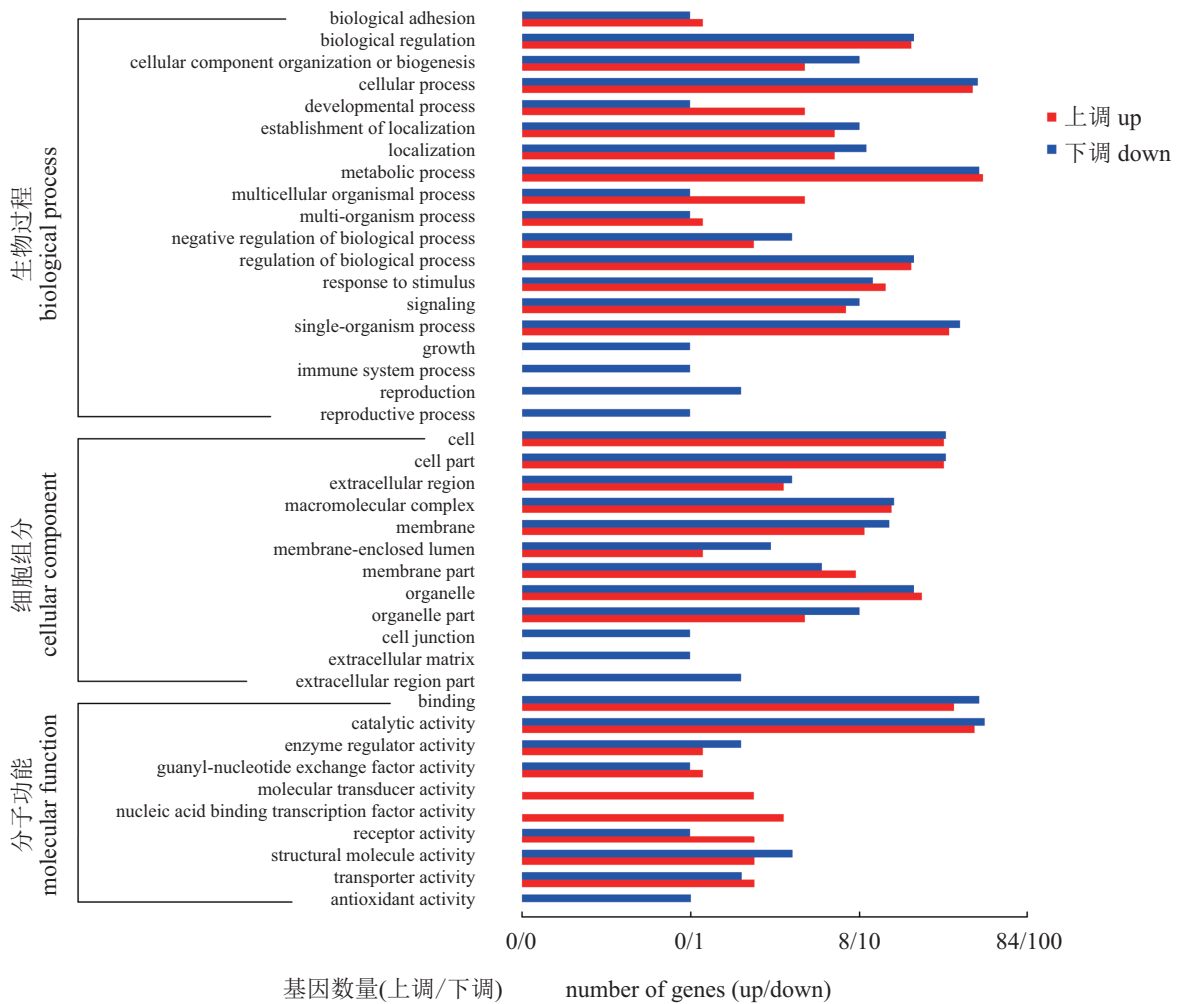


图 2 显著差异表达基因的GO分类

Fig. 2 GO classification statistics of significant differentially expressed genes



part)、大分子配合物(macromolecular complex)、膜(membrane)、细胞器(organelle)相关基因富集较多;在分子功能一类中,催化活性(catalytic activity)、酶调节活性(enzyme regulator activity)相关基因富集较多。

**KEGG Pathway显著性富集分析** 为了进一步深入了解正常与性早熟河蟹的Y-器官转录组差异表达基因之间的相互联系,通过KEGG富集分析,将文库中的差异表达基因富集到134条特定的KEGG代谢途径上,其中差异基因显著性富集的4条代谢通路分别为酮体合成和降解(synthesis and degradation of ketone bodies, ko00072)、丁酸甲酯代谢(butanoate metabolism, ko00650)、神经营养因子信号通路(neurotrophin signaling pathway, ko04722)、碱基切除修复(base excision repair, ko03410)。

### 3 讨论

RNA-seq技术是近年来发展起来的新一代高通量测序技术,已经被广泛关注并逐渐应用于水产动物的研究中,该技术已在水产动物应激反应、种质资源和病理等诸多方面的研究取得了进展。本研究利用RNA-seq技术对河蟹性早熟与正常幼蟹进行转录组测序,获得大量基因序列及其注释信息,下面对KEGG Pathway显著性富集的通路和筛选出的重要差异表达基因进行初步分析和讨论。

#### 3.1 酮体合成和降解、丁酸甲酯代谢通路差异表达基因的初步分析

在KEGG Pathway显著性富集的酮体合成和降解(图3)以及丁酸甲酯代谢通路(图4)中有多种基因表达下调:乙酰CoA酰基转移酶基因(*acetyl-CoA Acetyltransferase, AACT*; E2.3.1.9)、3-羟基丁酸脱氢酶基因(E1.1.1.30)、乙酰乙酰基辅酶A合成酶基因(E1.1.99.2)和2-羟基戊二酸脱氢酶基因(E1.1.99.2)。其中AACT是甲羟戊酸途径的起始酶,而此途径既是甲基法尼酯(MF)合成的途径,也是胆固醇及其衍生物合成的途径<sup>[11]</sup>。众所周知,甲壳动物含有多种内分泌器官,如Y-器官、大颚器和性腺等,这些器官可分泌以固醇类为前体的多种激素,且器官间存在着相互调节作用。王凤皎等<sup>[12]</sup>通过荧光定量的方法发现AACT基因在三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)

X-窦腺、Y-器官和大颚器中表达量较高,并认为三个内分泌器官间功能密切相关。

现已证实甲壳动物Y-器官可以合成和分泌蜕皮酮,主要调节蜕皮等生理过程;大颚器主要分泌MF;X-器官-窦腺复合体主要分泌蜕皮抑制激素(MIH)、高血糖激素、性腺抑制激素和大颚器抑制激素;而性腺分泌17 $\beta$ -雌二醇(E2)和睾酮等。在Y-器官中,胆固醇先被Neverland蛋白催化为7-脱氢胆固醇,然后由细胞色素P450逐渐转化为 $\alpha$ -蜕皮酮, $\alpha$ -蜕皮酮进入血液后在20-羟基蜕皮甾酮酶的作用下,形成具有活性的20-羟基蜕皮酮( $\beta$ -蜕皮酮)<sup>[13]</sup>。甲壳动物血淋巴中20-羟基蜕皮酮的含量随着蜕皮周期变化而变化,大致为蜕皮间期含量较低,蜕壳前期达到最大值,经过蜕壳20-羟基蜕皮酮含量降低,而后进入下一次蜕壳准备期<sup>[14]</sup>。本研究发现正常雌性幼蟹与性早熟蟹Y-器官转录组内蜕皮激素合成相关的Neverland, *CYP307A1/2*、*CYP306A1*、*CYP302A1*等细胞色素P450基因无显著差异。这可能是所取材料属于蜕壳间期,此时河蟹并不会大量合成和分泌蜕皮酮造成的。

MF是一种倍半萜类化合物,与昆虫保幼激素Ⅲ结构相似。MF作用于Y-器官可使其分泌蜕皮甾类含量明显增加<sup>[15]</sup>,在一定程度上会使甲壳动物蜕皮加速。但同时MF能刺激性腺发育成熟,如果大颚器大量合成和分泌MF会导致河蟹性早熟<sup>[16]</sup>。本转录组分析发现,甲基法尼酯环氧酶基因(*CYP15A1*)两组的表达无显著差异,而保幼激素环氧化物水解酶(*JHEH*)基因在早熟蟹表达上调。这表明河蟹Y-器官可以将大颚器分泌的MF环氧化生成保幼激素Ⅲ, *JHEH*基因表达上调可能是诱发河蟹性早熟的原因之一。

众多研究认为, X-器官-窦腺复合体生成的MIH作用于Y-器官,会对蜕皮酮的合成产生抑制作用,进而影响蜕壳。Lee等<sup>[17]</sup>研究发现蓝蟹(*Callinectes sapidus*)MIH的mRNA蜕皮周期中含量变化规律与上述20-羟基蜕皮酮变化相反,这一研究结果也支持上述观点。Nakatsuji等<sup>[18]</sup>对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)Y-器官体外培养的研究发现MIH可能与环化核苷酸磷酸二酯酶(PDE)存在拮抗作用。在本研究转录组分析中发现PDE基因下调,这一下调是否会引起MIH作用增强进而影响蜕皮酮合成以及对蜕皮调控尚不清楚。本研究还发现Y-器官中琥珀酸半醛脱氢酶基因



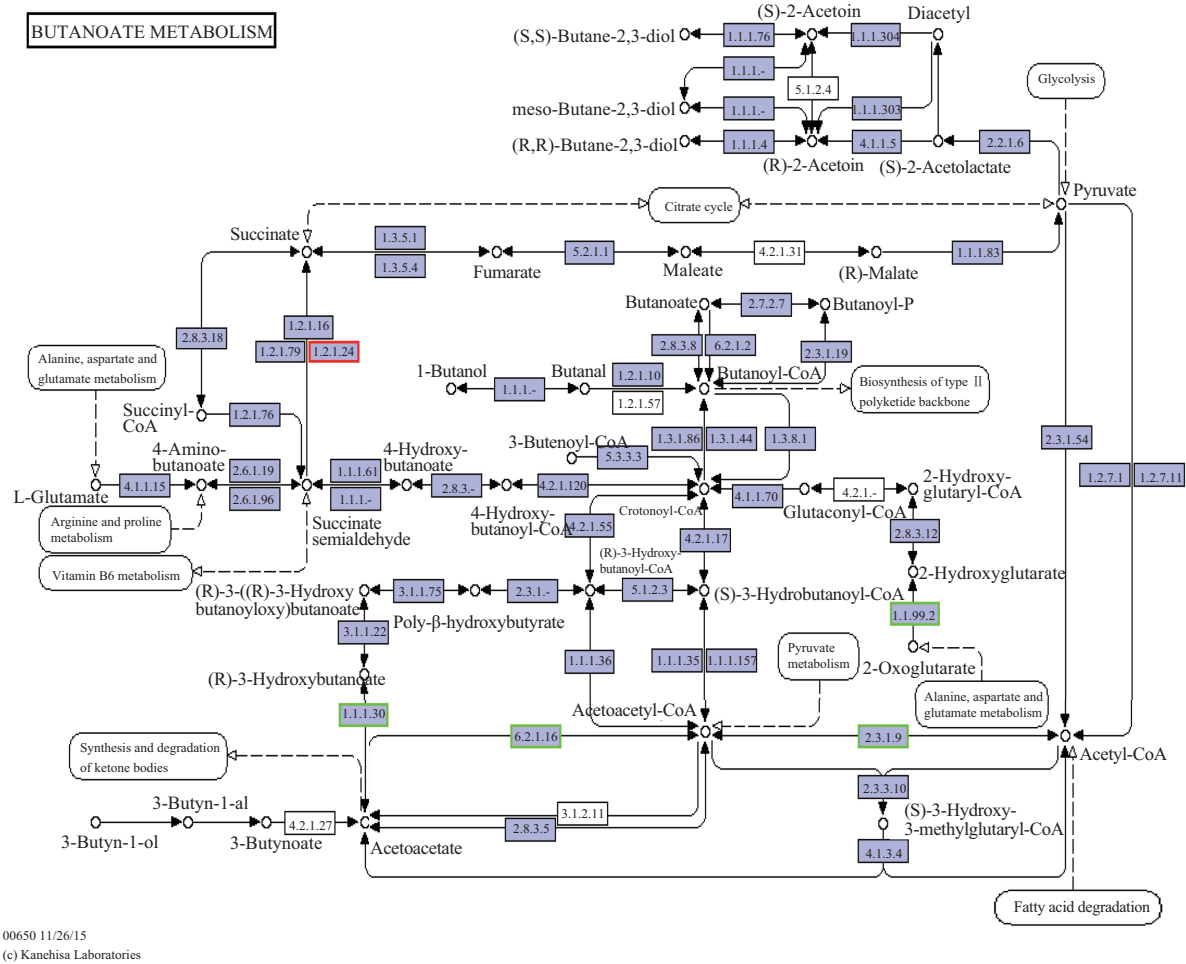


图 4 差异表达基因在丁酸甲酯代谢通路中的定位

Butanoate metabolism: 丁酸甲酯代谢; Alanine, aspartate and glutamate metabolism: 丙氨酸, 天冬氨酸和谷氨酸代谢; Arginine and proline metabolism: 精氨酸和脯氨酸代谢; Vitamin B<sub>6</sub> metabolism: 维生素B<sub>6</sub>代谢; Citrate cycle: 柠檬酸循环; Biosynthesis of type II polyketide backbone: II型聚酮骨架的生物合成, 图中红色的表示上调基因, 下同

Fig. 4 Differentially expressed genes location in pathway of butanoate metabolism

Up-regulated genes are marked by red rectangle, the same below

因子信号通路(图5)和碱基切除修复(图6)。神经营养因子信号通路中ARMS、Rap1和MAPKAPK2下调, 而CREB、cAb1、FKHRL1和C3G上调。神经营养因子可对神经元的生长、发育、分化、存活、凋亡和损伤后修复进行调节。碱基切除修复中XRCC1下调, Pok上调, 而可以注释到PARP的两个基因分别上调和下调。其他与DNA修复相关的基因表达情况为: ALKBH4、RAD54、Mre11、MLH1下调; RFC、CSB、RFC上调。甲壳动物的Y-器官与昆虫的前胸腺同源[22]。许多昆虫的前胸腺会随着变态过程出现细胞凋亡而消失, 河蟹Y-器官类似的现象已被证实[6]。本研究发现上述基因的上调或下调是否参与了此过程还有待进一步证明。此外, 本研究发现Na<sup>+</sup>,

K<sup>+</sup>-ATPase基因下调。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase可以维持细胞膜内外跨膜电化学梯度以及渗透压, 对生物体能量代谢以及生理活动正常进行有着重要意义。如果细胞内Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase活性降低, 可能产生物质代谢和能量代谢紊乱, 从而会使细胞结构、形态以及功能产生异常, 严重会导致细胞凋亡[23]。此外, 核糖体蛋白L5、L11、L51/S25基因上调, 线粒体蛋白、与细胞内的第二信使cAMP相关的PI3K-Akt和MAPK信号通路、DNA复制、细胞周期、细胞凋亡、离子转运等过程相关基因表达存在差异。

3.3 其他重要差异表达基因的初步分析

光照和温度也是诱发河蟹性早熟的原因。

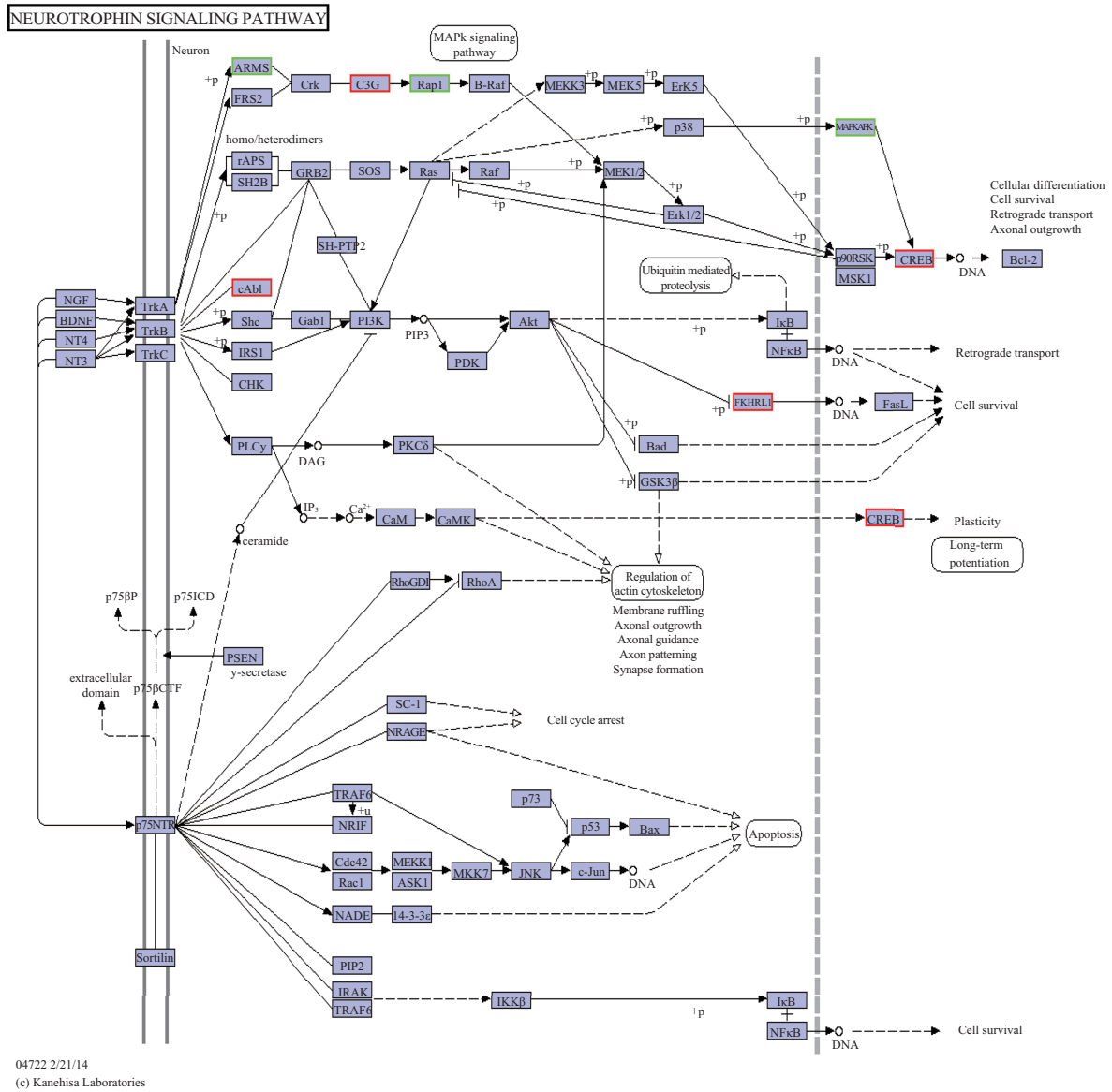


图 5 差异表达基因在神经营养因子信号通路中的定位

Neurotrophin signaling pathway: 神经营养因子信号通路; MAPK signaling pathway: MAPK信号通路; Ubiquitin mediated proteolysis: 泛素介导的蛋白质降解; Regulation of actin cytoskeleton: 肌动蛋白细胞骨架调节; Long-term potentiation: 长时程增强; Apoptosis: 细胞凋亡

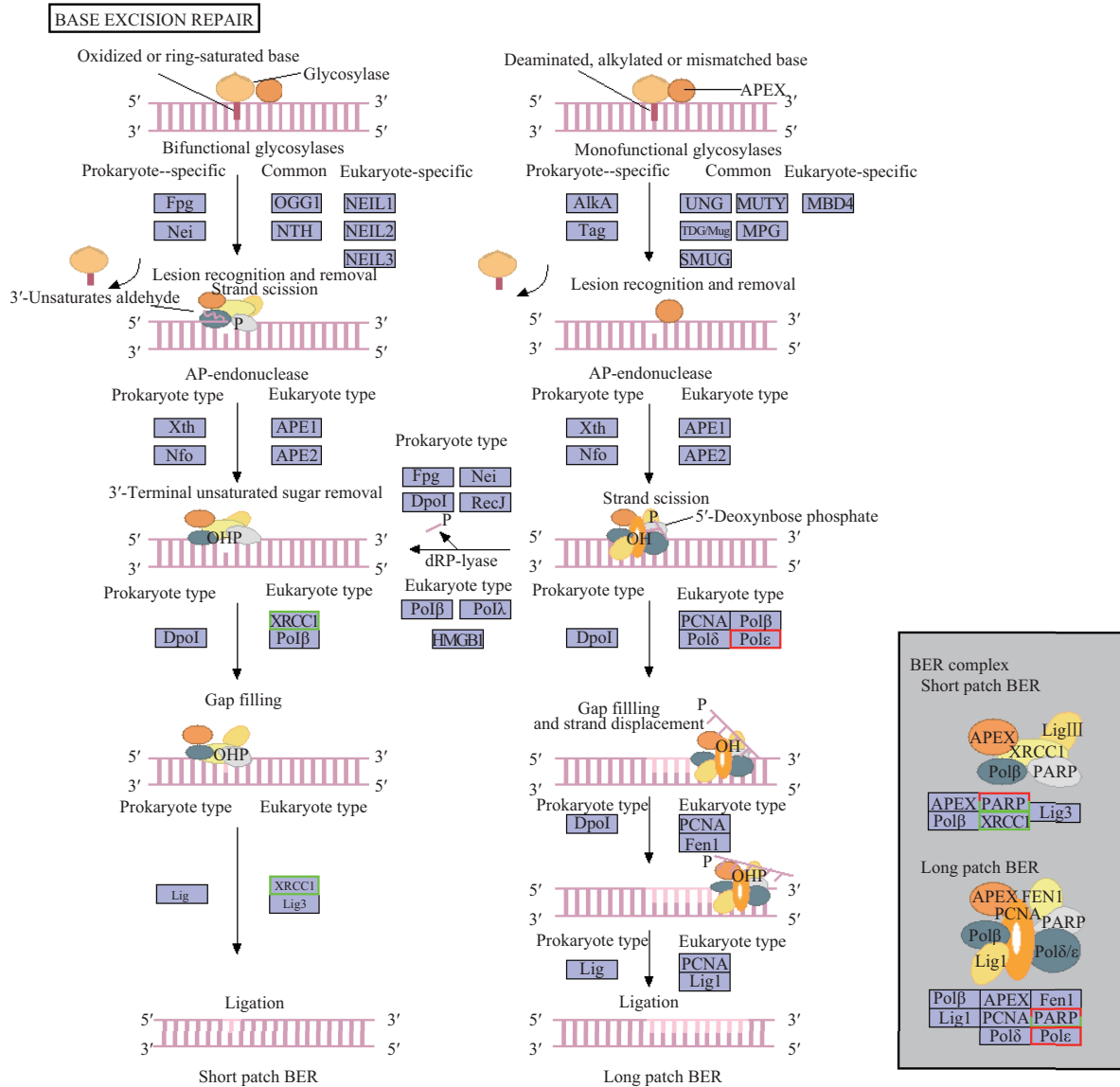
Fig. 5 Differentially expressed genes location in neurotrophin signaling pathway

与光传导相关的 *cry* 基因可以调节许多物种的昼夜节律，是一个关键的生物钟基因。它还与昆虫类的滞育现象相关<sup>[24]</sup>，同时 *cry* 基因还对果蝇有抗衰老功能<sup>[25]</sup>，若提高 *cry* 基因表达则延长果蝇的寿命，而 *cry* 基因缺失时果蝇突变体中生命体功能加速下降，同时有更大氧化损伤的积累。而本研究发现性早熟蟹的 *cry* 基因表达明显下调。热休克蛋白 (heatshock protein)，是一组具有高度保守性的应激蛋白，在许多与高温等环境胁迫的研究中都出现显著增加<sup>[26-27]</sup>。本研究在性早熟蟹中同样发现 *HSP70* 基因表达上调。另

外，很多报道指出 GABA 参与了热应激过程<sup>[28]</sup>，上文中提到的其关键代谢酶 *ALDH5A1* 表达上调，此酶可能会通过 GABA 调控热应激过程。

此外，在转录组差异表达基因中也发现了与维生素代谢相关的酶基因。全反式视黄醇脱氢酶 (*SDR16C5*) 基因表达下调，此酶可以将维生素 A 代谢为视黄醛，是内源性视黄酸生成的限速步骤<sup>[29]</sup>，维生素 A 及其代谢产物与脂质代谢相关。磷酸吡哆醇氧化酶 (*PNPO*) 基因下调，PNPO 是生物体内维生素 B<sub>6</sub> 代谢调控的关键点<sup>[30]</sup>，维生素 B<sub>6</sub> 与氨基酸代谢相关。而叶酸及其生物活性的





03410 1/20/15  
(c) Kanehisa Laboratories

图 6 差异表达基因在碱基切除修复通路中的定位

Base excision repair: 碱基切除修复

Fig. 6 Differentially expressed genes location in pathway of base excision repair

代谢产物参与了氨基酸转换、蛋白质合成和核酸的代谢<sup>[31]</sup>, 其代谢相关的亚甲基四氢叶酸脱氢酶(*MTHFD*)基因下调。

综上所述, 正常与性早熟河蟹的Y-器官转录组分析发现, 性早熟的河蟹Y-器官中, 热休克蛋白*HSP70*、MF的水解酶*JHEH*、GABA代谢中*ALDH5A1*以及E2代谢酶*17β-HSD2*等基因表达上调。而与酮体合成和降解、丁酸甲酯代谢的许多酶基因, *cry*基因, 若干与维生素A、维生素B<sub>6</sub>和叶酸代谢相关的酶基因, 以及Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase基因表达均下调。本实验通过转录组高

通量测序技术, 利用生物信息学的方法获得了正常与性早熟河蟹Y-器官转录组注释信息, 并筛选出正常与性早熟蟹Y-器官的差异表达基因进行初步分析, 同时为河蟹Y-器官转录组的研究提供基础资料。

张佳鑫与徐敏杰为本文共同第一作者。

参考文献:

[1] 张列士, 徐琴英. 自然及养殖水体河蟹性成熟和性早熟的研究[J]. 水产科技情报, 2001, 28(3): 106-111.

- Zhang L S, Xu Q Y. Studies on sex maturity and early maturity of mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in natural and farming water[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2001, 28(3): 106-111(in Chinese).
- [ 2 ] 魏薇, 吴嘉敏, 魏华. 盐度对中华绒螯蟹性早熟生理机制的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(2): 275-280.
- Wei W, Wu J M, Wei H. Physiological mechanism of precociousness influenced by salinity in juvenile *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 275-280(in Chinese).
- [ 3 ] 李云峰, 康现江, 赵晓瑜, 等. 河蟹性早熟发生的相关内在因素研究进展[J]. 水产科学, 2005, 24(2): 34-36.
- Li Y F, Kang X J, Zhao X Y, *et al.* Intrinsic factors of precocity in mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fisheries Science, 2005, 24(2): 34-36(in Chinese).
- [ 4 ] Vigh D A, Fingerman M. Molt staging in the fiddler crab *Uca pugilator*[J]. Journal of Crustacean Biology, 1985, 5(3): 386-396.
- [ 5 ] Hayd L A, Anger K, Valenti W C. The moulting cycle of larval Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* reared in the laboratory[J]. Nauplius, 2008, 16(2): 55-63.
- [ 6 ] 赵维信, 陆剑峰. 中华绒螯蟹Y-器官在蜕皮周期中的超微结构[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 74-77.
- Zhao W X, Lu J F. Ultrastructure of Y-organ in *Eriocheir sinensis* during molt cycle[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(1): 74-77(in Chinese).
- [ 7 ] Wang C H, Wachholtz M, Wang J, *et al.* Analysis of the skin transcriptome in two Oujiang color varieties of common carp[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90074.
- [ 8 ] 陈阿琴, 张影, 陈松林, 等. 不同光周期条件下日本牙鲆尾部神经内分泌系统转录组分析[J]. 水产学报, 2016, 40(6): 833-843.
- Chen A Q, Zhang Y, Chen S L, *et al.* The transcriptome sequencing and functional analysis of CNSS in *Paralichthys olivaceus* treated with different photoperiods[J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(6): 833-843(in Chinese).
- [ 9 ] Grabherr M G, Haas 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.
- [10] Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, *et al.* BLAST+: architecture and applications[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 421.
- [11] Goldstein J L, Brown M S. Regulation of the mevalonate pathway[J]. Nature, 1990, 343(6257): 425-430.
- [12] 王凤皎, 朱冬发, 邱锡尔, 等. 三疣梭子蟹*AACT*基因克隆及其在卵巢发育中的表达分析[J]. 水产学报, 2015, 39(6): 790-798.
- Wang F J, Zhu D F, Qiu X E, *et al.* Cloning and expression analysis of acetyl-CoA C-acetyltransferase (*AACT*) in *Portunus trituberculatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(6): 790-798(in Chinese).
- [13] Mykles D L. Ecdysteroid metabolism in crustaceans[J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 127(3-5): 196-203.
- [14] 焦满静. 中华绒螯蟹蜕皮机制与影响因素的研究[D]. 保定: 河北大学, 2013.
- Jiao M J. Study on the mechanisms and influencing factors of the molting in *Eriocheir sinensis*[D]. Baoding: Hebei University, 2013 (in Chinese).
- [15] Tamone S L, Chang E S. Methyl farnesoate stimulates ecdysteroid secretion from crab Y-organs *in vitro*[J]. General and Comparative Endocrinology, 1993, 89(3): 425-432.
- [16] 赵维信, 陆剑峰. 中华绒螯蟹大颚器激素生物合成与性早熟的关系[J]. 水产学报, 2003, 27(4): 289-294.
- Zhao W X, Lu J F. The relationship between hormone biosynthesis of mandibular organ and precociousness in *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2003, 27(4): 289-294(in Chinese).
- [17] Lee K J, Elton T S, Bej A K, *et al.* Molecular cloning of a cDNA encoding putative molt-inhibiting hormone from the blue crab, *Callinectes sapidus*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995, 209(3): 1126-1131.
- [18] Nakatsuji T, Sonobe H, Watson R D. Molt-inhibiting hormone-mediated regulation of ecdysteroid synthesis in Y-organs of the crayfish (*Procambarus clarkii*): involvement of cyclic GMP and cyclic nucleotide phosphodiesterase[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006, 253(1-2): 76-82.
- [19] 孙金生, 高春蕾, 相建海. 中华绒螯蟹眼柄MTXO细胞GABA受体通道研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 129-133.
- Sun J S, Gao C L, Xiang J H. Study on the GABA gated

- channels in the neurosecretory cells of MTXO in the eyestalks of *Eriocheir sinensis*[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2003, 30(1): 129-133(in Chinese).
- [20] 吴嘉敏, 姜新耀. 中华绒螯蟹血淋巴钙离子和17 $\beta$ -雌二醇浓度与性早熟的关系[J]. *水产学报*, 2001, 25(2): 112-115.
- Wu J M, Jiang X Y. The relationships between Ca<sup>2+</sup>, 17 $\beta$ -estradiol levels in the hemolymph and precociousness of *Eriocheir sinensis*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2001, 25(2): 112-115(in Chinese).
- [21] Rantakari P, Strauss L, Kiviranta R, *et al.* Placenta defects and embryonic lethality resulting from disruption of mouse hydroxysteroid (17- $\beta$ ) dehydrogenase 2 gene[J]. *Molecular Endocrinology*, 2008, 22(3): 665-675.
- [22] Lachaise F, Le Roux A, Hubert M, *et al.* The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review)[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 1993, 13(2): 198-234.
- [23] 孔祥会, 王桂忠, 李少菁. 甲壳动物Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase研究概况[J]. *水产科学*, 2005, 24(10): 42-45.
- Kong X H, Wang G Z, Li S J. A review: Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in crustacea[J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(10): 42-45(in Chinese).
- [24] Yamada H, Yamamoto M T. Association between circadian clock genes and diapause incidence in *Drosophila triauraria*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(12): e27493.
- [25] Rakshit K. Exploring functional links between circadian clocks, neurodegeneration, and aging in *Drosophila melanogaster*[D]. Oregon, USA: Oregon State University, 2013.
- [26] Wu R, Sun Y, Lei L M, *et al.* Molecular identification and expression of heat shock cognate 70 (*HSC70*) in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Molecular Biology*, 2008, 42(2): 234-242.
- [27] Tedengren M, Olsson B, Reimer O, *et al.* Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48(1): 1-12.
- [28] Eguchi Y, Ihara M, Ochi E, *et al.* Functional characterization of *Musca* glutamate-and GABA-gated chloride channels expressed independently and coexpressed in *Xenopus* oocytes[J]. *Insect Molecular Biology*, 2006, 15(6): 773-783.
- [29] 王萍, 刘晓东. 细胞色素P450酶与维生素A的代谢[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(4): 474-480.
- Wang P, Liu X D. Cytochrome P450s and the metabolism of vitamin A[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2011, 16(4): 474-480(in Chinese).
- [30] Di Salvo M, Yang E, Zhao G S, *et al.* Expression, purification, and characterization of recombinant *Escherichia coli* pyridoxine 5'-phosphate oxidase[J]. *Protein Expression and Purification*, 1998, 13(3): 349-356.
- [31] Stokstad E L, Koch J. Folic acid metabolism[J]. *Physiological Reviews*, 1967, 47(1): 83-116.

## Transcriptome sequencing and functional analysis of Y-organs between normal and precocious Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*)

ZHANG Jiaxin, XU Minjie, HUANG Genyong,  
ZHANG Cong, YANG Zhigang, CHENG Yongxu, YANG Xiaozhen\*

(Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture,  
Shanghai Engineering Research Center of Aquaculture, National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education,  
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Precocity is a common problem in aquaculture of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). To discover and clone important functional genes, the transcriptome of Y-organs of precocious and normal female crabs were sequenced by Illumina Hiseq 2000 high-throughput sequencing technology, and comparative transcriptome study was conducted. The results showed that precocious and normal crabs had 44 619 538 and 43 052 958 clean reads, respectively. Comparison between the sequencing data from precocious and normal female crabs revealed 2 655 differentially expressed genes. The differentially expressed genes GO functions in the transcriptome library were broadly divided into three major ontology (biological processes, cellular component and molecular function categories) of 42 branches. Data in the transcriptome from 134 differentially expressed genes could be divided into 4 classes taking the KEGG database as a reference, according to the metabolic pathway, including synthesis and degradation of ketone bodies, butanoate metabolism, neurotrophin signaling pathway, and base excision repair. By RNA-seq, we obtained abundant transcriptome information that could contribute to novel gene identification, causes and prevention of precocity, and research of Y-organs in *Eriocheir sinensis*.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; precocity; Y-organ; transcriptome

**Corresponding author:** YANG Xiaozhen. E-mail: xzyang@shou.edu.com

**Funding projects:** National Natural Science Fund of China (31272677; 31472287); Shanghai Agricultural Commission (2015D1-7); Shanghai Science and Technology Commission (16DZ2281200); China Agriculture Research System



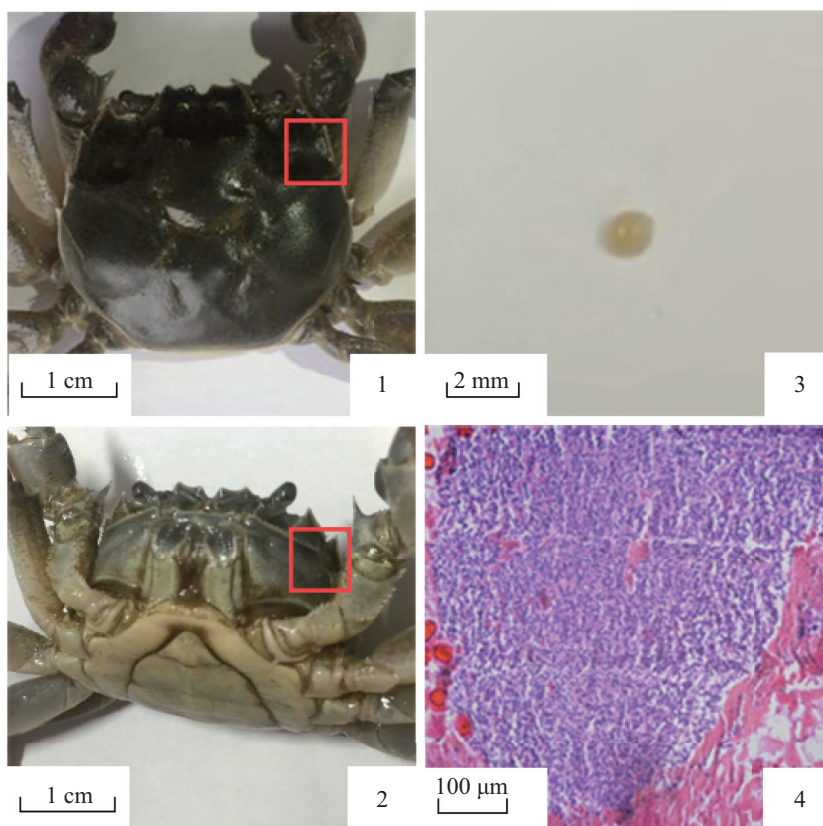


图版 I 正常与性早熟中华绒螯蟹对照

1. 正常蟹的形态, 2. 早熟蟹的形态, 3. 正常蟹的解剖图, 4. 早熟蟹的解剖图

**Plate I Comparison of normal and precocious *E. sinensis***

1. morphology of normal crab, 2. morphology of precocious crab, 3. anatomical images of normal crab, 4. anatomical images of precocious crab



图版 II 中华绒螯蟹Y-器官的解剖位置和形态结构

1. Y-器官在背面位置 (红框内), 2. Y-器官在腹面位置 (红框内), 3. Y-器官外观图, 4. Y-器官的组织结构

**Plate II Anatomical position, morphology and structure of Y-organ in *E. sinensis***

1. location of Y-organ in back shells (In the red box), 2. location of Y-organ in front shells (In the red box), 3. external view of Y-organ, 4. the histological structure of Y-organ