

红螯光壳螯虾响应长期水体盐度胁迫的基因和代谢通路

刘树彬¹, 徐畅^{1*}, 贾永义², 顾志敏², 李二超^{1*}

(1. 海南大学海洋学院, 海南省水产种业工程研究中心,
海南省热带水生生物技术重点实验室, 海口 570228;
2. 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001)

摘要: 为探究长期盐度胁迫条件下红螯光壳螯虾肠道基因表达和代谢通路的变化。实验采用 Illumina HiSeq 2500 平台对 0、5、10 和 15 这 4 个盐度下养殖 5 周的红螯光壳螯虾的肠道组织进行了高通量测序。研究共获 76 534 个 unigenes, 通过与 NR、NT、KO、Swissprot、PFAM、GO 和 KOG 数据库进行比对, 成功注释 37 378 个 unigenes。通过引入 FPKM (Fragments Per Kilo bases per Million fragments) 来估算基因表达水平, 基于 NR 和 Pfam 两个数据库的蛋白注释结果, 448 362 个 unigenes 在 GO 数据库得到注释。根据 KO 功能注释与 Pathway 的联系, 9 483 个 unigenes 在 KEGG 数据库被注释分类到 34 条通路途径。通过 DEGseq 进行基因表达差异分析, 以盐度 0 为对照组, 显著差异基因筛选条件设置为 Q value < 0.05 且差异倍数 |Fold Change| > 2, 盐度 5、10 和 15 组分别获得差异基因 2 733、91 和 236 个, 其中盐度 5 组共有 2 068 个基因显著上调, 665 个基因显著下调。将所有差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析, 盐度 5、10 和 15 组分别富集到 265、80 和 120 条通路, 仅有盐度 10 和 15 组分别有一条显著富集的通路, 均为军团杆菌病通路。经过鉴定, 军团杆菌病通路显著下调, 这与团队针对肠道菌群的研究结果一致。表明红螯光壳螯虾在盐度胁迫下, 可通过抑制潜在病原菌相关通路以及丰度, 达到保护肠道避免外环境病原菌侵袭的效果。此外, *eEF1α*、*udp*、*UPP*、*ACTB_G1*、*TUBA*、*TUBB*、*PFN*、*CALM* 等差异基因的变化说明盐度升高可显著影响红螯光壳螯虾肠道的细胞形态、细胞内物质运输和细胞内信号转导途径, 但红螯光壳螯虾启动嘧啶补救合成途径可以修复尿嘧啶核苷酸比例失衡导致的遗传损伤。研究结果可为红螯光壳螯虾的半咸水养殖提供重要的理论支持, 同时也可深入研究红螯光壳螯虾盐度胁迫下的肠道免疫调控机制提供参考。

关键词: 红螯光壳螯虾; 盐度胁迫; 肠道; 高通量测序; 差异表达分析

中图分类号: Q 786; S 917.4

文献标志码: A

红螯光壳螯虾 (*Cherax quadricarinatus*) 属十足目 (Decapoda) 拟螯虾科 (Parastacidae), 俗称澳洲淡水龙虾, 原产于澳大利亚, 虾体呈现褐绿色, 因雄性个体在螯肢外前缘具膜质鲜红斑块, 故又

被赋予红螯光壳螯虾的美称^[1]。红螯光壳螯虾具有生长速率快、适应水温范围广^[2]、经济效益佳^[3]、耐长途离水运输等优点, 已在全世界范围内大面积推广养殖^[4]。研究发现, 将养殖末期的

收稿日期: 2020-09-22 修回日期: 2021-03-17

资助项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0901305); 海南大学科研启动经费 (KYQD(ZR)1924)

第一作者: 刘树彬 (照片), 从事水生动物营养研究, E-mail: 609801601@qq.com

通信作者: 徐畅, 从事水产动物营养学和生理学研究, E-mail: cxu@hainanu.edu.cn;

李二超, 从事水产动物营养学和生理学研究, E-mail: ecl@bio.ecnu.edu.cn



红螯光壳螯虾置于半咸水(盐度高达25)环境下1~2 d,可促使更多游离氨基酸被释放,显著提高红螯光壳螯虾风味^[5]。虽为淡水物种,但红螯光壳螯虾也可表现出对环境盐度一定的耐受性,然而水体盐度的升高往往也会伴随着存活率的降低^[4-5],中长期(35 d)盐度15养殖条件下,存活率为81.5%^[6]。对优质水产品的需求使得对红螯光壳螯虾的研究由主要集中在关注优化生长表现方面^[7-8],开始转移到多变环境因子下机体生理响应机制的研究^[6,9]。

淡水资源短缺已成为限制多数发展中国家水产养殖发展的主要因素之一^[10],越来越多的咸水和半咸水水域被用来开展水产养殖^[11-12],利用咸水或半咸水资源开展广盐性水产动物的养殖逐渐成为了一种趋势^[13]。水体盐度会对淡水水产动物的生长和生理造成一定的负面影响^[14-15]。环境压力下,红螯光壳螯虾在生长表现、免疫功能和生理响应等方面做出适应性调节^[16]。广盐性水产动物的肠道不仅是消化和吸收营养物质的器官^[17],在免疫功能以及渗透压平衡方面也起着至关重要的调节作用^[18]。大量研究表明,水体盐度胁迫对水产动物肠道组织结构、消化酶活性、抗氧化能力、非特异性免疫功能以及肠道菌群组成均会产生显著影响^[19-20]。但是,肠道作为调节免疫和渗透压的关键器官,在盐度胁迫下的调控机制有待进一步探究。

水体环境胁迫会导致机体内部若干代谢途径的网络式响应^[21]。高通量测序技术的不断发展使大规模检测机体代谢途径响应成为可能,为深入探究环境因子对机体的综合生理影响提供技术支撑。通过对肝胰腺和性腺转录组学分析,对红螯光壳螯虾生长发育期间关键基因的表达进行了深入研究,开发出了红螯光壳螯虾功能性简单重复序列(SSR)标记,为其分子标记辅助选育奠定了基础^[22]。低温胁迫下,红螯光壳螯虾肝胰腺转录组学的结果表明,差异基因主要参与物质和能量代谢、抗氧化防御、免疫防御、信号转导和凋亡调控等细胞代谢途径,同时非特异性免疫应答反应受到抑制,而细胞凋亡代谢途径活性提高^[23]。盐度和pH胁迫下对红螯光壳螯虾鳃转录组分析发现,渗透压调节相关基因的表达变化显著^[24]。但迄今,红螯光壳螯虾肠道在环境盐度胁迫下的分子响应机制尚未见报道。

本研究利用转录组测序(RNA-Seq, Illumina

PE150)技术对不同水体盐度下的红螯光壳螯虾肠道基因表达情况进行比较分析,对机体响应环境盐度胁迫的基因进行了深入地筛选、鉴定和挖掘,同时深入分析显著响应的信号通路。研究结果丰富了甲壳动物环境生理学的内容,同时也为红螯光壳螯虾半咸水养殖提供了一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验用虾及肠道收集

实验设置盐度为0、5、10和15共4个处理组,每个处理组设置4个平行。实验用红螯光壳螯虾(18.28±0.03)g取自浙江省淡水水产研究所湖州市八里店镇试验基地,将同一批的192尾健康的红螯光壳螯虾随机均分至16个养殖池(640 L),在淡水中暂养1周。随后,以每天升高2.5盐度的速率将水体盐度分别调整至盐度5、10和15。在所有处理组达到目标盐度后正式开始实验,养殖周期35 d。每天饱食投喂3次(9:00、16:00、22:00)商业饲料(39.64%粗蛋白、7.71%粗脂肪、12.00%灰分和10.00%水分),用充分曝气的等盐度水体每天换水1次,使用盐度计校正盐度。实验结束时,每个养殖池中随机抽取2尾红螯光壳螯虾,快速解剖采集肠道组织,经液氮速冻后保存于-80℃冰箱。

1.2 肠道RNA提取

依照transuprna分离试剂盒(Biostar,中国上海)厂家的说明方法提取、制备组织总RNA。使用NanoDrop™ 2000分光光度计(Thermo Scientific,美国)检测样品的质量和浓度,通过1%琼脂糖凝胶电泳检测样品的完整性。

1.3 RNA测序文库构建和Illumina测序

使用Oligo(dT)磁珠(Illumina,美国)从总RNA中分离和富集mRNA。将获得的mRNA片段利用裂解缓冲液切成短片段作为模板,利用六碱基随机引物合成cDNA第一链。使用缓冲液、dNTPs、RNase H和DNA聚合酶i合成第二链cDNA。根据基因组样品制备试剂盒(Illumina,美国)说明方法合成双末端cDNA文库。短片段用QIAQuick1PCR提取试剂盒(QIAGEN,德国)纯化,用EB缓冲液(QIAGEN,德国)洗脱。利用AMPure XP beads(Illumina,美国)对双链cDNA进行筛选并扩增纯化,纯化产物通过琼脂糖凝胶电

泳选择大小约 50 bp 的片段。最后, 在 Illumina HiSeq 2500 (诺禾致源, 中国) 上进行 cDNA 文库测序。

1.4 测序数据的组装和基因注释

高通量测序得到的原始数据通过碱基识别转换为原始序列数据 (Raw reads), 并以 fastq 格式储存。原始序列数据通过去除接头、空读取和低质量序列来过滤得到干净序列数据 (Clean reads)。采用 Trinity 对 clean reads 进行拼接, 对 Trinity 拼装得到的转录本去除冗余, 以 Corset 层次聚类后得到最长 Cluster 序列作为 unigene 进行后续的分析^[25], 统计转录本及聚类序列长度。

将 unigene 与七大公共数据库中的序列进行比较, 统计注释成功率。七大公共数据库包括 NCBI 官方蛋白序列数据库 (NR)、NCBI 官方核酸序列数据库 (NT)、PFAM 蛋白结构域注释数据库 (PFAM)、KEGG 同源性关系数据库 (KOG)、Swiss-Prot 蛋白质序列数据库 (SwissProt)、KEGG 直接同源注释系统 (KO) 和国际标准化基因功能分类系统 (GO)。使用 10^{-5} 作为截止 e 值, 基于 NR 和 Pfam 两个数据库的蛋白注释结果, 利用软件 Blast2GOv2.5 对被注释的 unigenes 进行分类, 将注释成功的基因按照 GO 3 个大类 (生物过程 BP、细胞组分 CC、分子功能 MF) 的下一层级进行分类^[26]。将 KOG 注释成功的 unigene 按 KOG 的 26 个组别进行分类。对 unigenes 做 KO 注释后, 根据 KO 与 Pathway 的联系对其进行 KEGG 代谢通路分类。

1.5 RNA-seq 基因标准化及差异基因表达

为了消除不同基因长度和序列差异对表达计算的影响, 使用 FPKM (Fragments Per Kilo bases per Million fragments) 对 RSEM 获得的读取计数的基因表达水平进行归一化转换^[27]。计算出的基因表达水平可用于样本间的直接比较。采用 DESeq2

程序进行分析, 筛选阈值为 $\text{padj} < 0.05$ 且 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$, 同时对原有假设检验得到的 P-value 进行校正^[28]。采用 KOBAS (2.0) 软件, 设置参数 fdr 为 BH (即使用 BH 校正) 进行差异表达基因 KEGG 富集分析, 显著性通过 Benjamini & Hochberg 方法校正^[29]。将差异基因映射到 KEGG 数据库进行通路富集分析, KEGG 富集程度通过富集因子、qvalue (多重假设检验校正之后的 P 值) 和富集到此通路上的基因个数来衡量, 其中富集因子是位于该通路的差异表达的基因数目与该通路被注释的基因总数的比值。

2 结果

2.1 转录组测序和组装

共获得 185 411 462 条原始序列。过滤后, 盐度 0、5、10 和 15 组分别得到 40 556 620 条、49 284 695 条、44 735 152 条和 47 331 219 条序列。四组数据 Q20 碱基比例均超过 97.5%, Q30 碱基比例均超过 93.2%, 表明数据质量适合后续分析 (表 1)。Trinity 将有效数据进行组装, 获得 154 303 个转录本, 去除冗余后得到 76 534 个 unigene, unigenes 长度大于 500 bp 的占比 61.26%, 长度大于 1 000 bp 的占比 31.21% (表 2)。

2.2 基因注释及分类

在 NR、PFAM 和 GO 数据库中得到注释的 unigene 占总基因数 30% 以上, 所有 unigene 中有 48.83% 至少可以在 1 个数据库中被注释, 然而仅有 4.23% 的 unigene 在 7 个数据库中均被注释 (表 3)。针对 5 个主要的蛋白数据库 NR、NT、KO、Swissprot 和 KOG, 被注释的 unigene 占比分别为 31.31%、20.39%、12.39%、21.98% 和 11.58%, 其中 4 151 个 unigene 在 5 个数据库中均被注释 (图 1)。

基于 NR 和 Pfam 两个数据库的蛋白注释结

表 1 红螯光壳螯虾肠道转录组的测序结果概述

Tab. 1 An overview of intestinal transcriptome sequencing from *C. quadricarinatus*

组别 group	原始数据/条 raw data	过滤后数据/条 clean data	错误率/% error	Q20百分比/% Q20	Q30百分比/% Q30	GC碱基比/% GC content
盐度0组 0‰ group	41 456 159	40 556 620	0.03	97.73	93.50	39.20
盐度5组 5‰ group	50 428 404	49 284 695	0.03	97.65	93.35	39.64
盐度10组 10‰ group	45 486 369	44 735 152	0.03	97.56	93.21	40.47
盐度15组 15‰ group	48 040 530	47 331 219	0.03	97.62	93.30	40.00

注: Q20、Q30 分别表示碱基测序质量值大于 20 和 30 的碱基占总体碱基的百分比
Notes: Q20 and Q30 represent the percentage of bases with mass values greater than 20 and 30 in the total bases

表2 红螯光壳螯虾肠道转录组拼接结果数据汇总

Tab. 2 Summary statistics of the intestinal transcriptome from *C. quadricarinatus*

项目 items	总数量/个 total numbers	数量/个 numbers		N50	N90	最大长度/bp max length	最小长度/bp min length	全长/bp total length
		≥500 bp	≥1 000 bp					
转录本 transcript	154 303	95 851	58 597	2 773	497	25 890	301	220 209 807
通用基因 unigene	76 534	46 886	23 890	1 925	448	25 890	301	88 002 281

注: N50、N90分别表示将拼接转录本按照长度从长到短排序,累加转录本的长度,到不小于总长50%和90%的拼接转录本的长度即为N50、N90
Notes: N50 and N90 are defined as arranging the spliced transcripts from large to small according to their length, and accumulating the length of transcripts to the length of spliced transcripts no less than 50% or 90% of their total length

表3 红螯光壳螯虾转录组基因注释结果统计

Tab. 3 Statistical results of transcriptome gene annotation from *C. quadricarinatus*

数据库 database	unigenes数目/个 number of unigenes	百分比/% percentage
NR	23 963	31.31
NT	15 610	20.39
KO	9 483	12.39
SwissProt	16 825	21.98
PFAM	23 425	30.60
GO	23 425	30.60
KOG	8 865	11.58
所有数据库 all databases	3 240	4.23
至少1个数据库 at least one database	37 378	48.83
总基因数 total unigenes	76 534	100

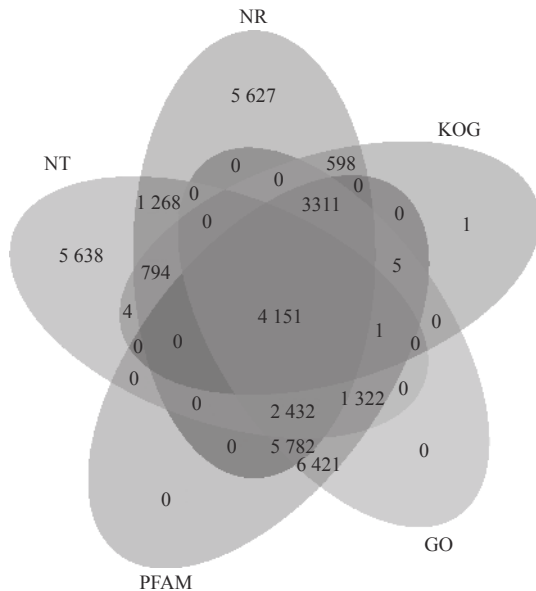


图1 红螯光壳螯虾蛋白数据库结果注释韦恩图

Fig. 1 Venn diagram analysis in the different protein databases of *C. quadricarinatus*

果, 448 362 个 unigenes 被注释到生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function,

MF) 和细胞组分 (cellular component, CC), 其数量分别为 298 968、100 860 和 48 534 个 (图 2-a)。其中被注释最多 unigenes 分类分别是细胞过程 (13 304 个 unigenes)、细胞 (7 862 个 unigenes) 和结合 (12 566 个 unigenes)。根据 KO 功能注释与 Pathway 的联系, 利用 KAAS 系统采用自动注释服务对 9 483 个 unigenes 进行 KEGG 代谢通路分类, 获得 34 条通路途径注释。将 34 条通路分为 5 类, 即有机系统、代谢、遗传信息处理、环境信息处理和细胞过程, 其 unigenes 数量分别为 2 532、2 485、1 741、1 293 和 1 472 个 (图 2-b)。

2.3 基因表达分析及评价

通过引入 FPKM 来计算样品中基因表达丰度, 根据表达丰度使用 DEGseq 软件进行差异表达分析, 设置 $Q \text{ value} < 0.05$ 且 $|\text{Fold Change}| > 2$ 来筛选显著差异基因。通过对照组与盐度 5、10 和 15 组比较发现, 盐度 5、10 和 15 组相比于对照组的差异基因分别有 2 733、91 和 236 个, 共有的差异基因 54 个 (图 3-a)。基于差异倍数 (Fold Change), 分别比较盐度 5、10 和 15 组与对照组样品的基因表达水平。结果表明, 盐度 5、10 和 15 组中, 盐度 5 组相比于对照组差异基因个数最多, 共 2 733 个, 其中 2 068 个基因显著上调, 665 个基因显著下调 (图 3-b)。

2.4 KEGG 数据库对差异基因富集分析

KEGG 通路富集分析结果显示, 盐度 5 组相比对照组, 显著变化的 2 733 个基因总共富集在 265 条通路上, 没有显著富集通路 (图 4-a)。盐度 10 组相比对照组, 显著变化的 91 个基因共富集在 80 条通路上, 其中显著富集通路仅 1 条, 为军团杆菌 (Legionellosis) 病通路 (图 4-b)。盐度 15 组与对照组相比, 显著变化的 236 个基因共富集到 120 条通路, 其中显著富集通路仅 1 条, 依旧是军团杆菌病通路 (图 4-c)。通过分析 KEGG 通路

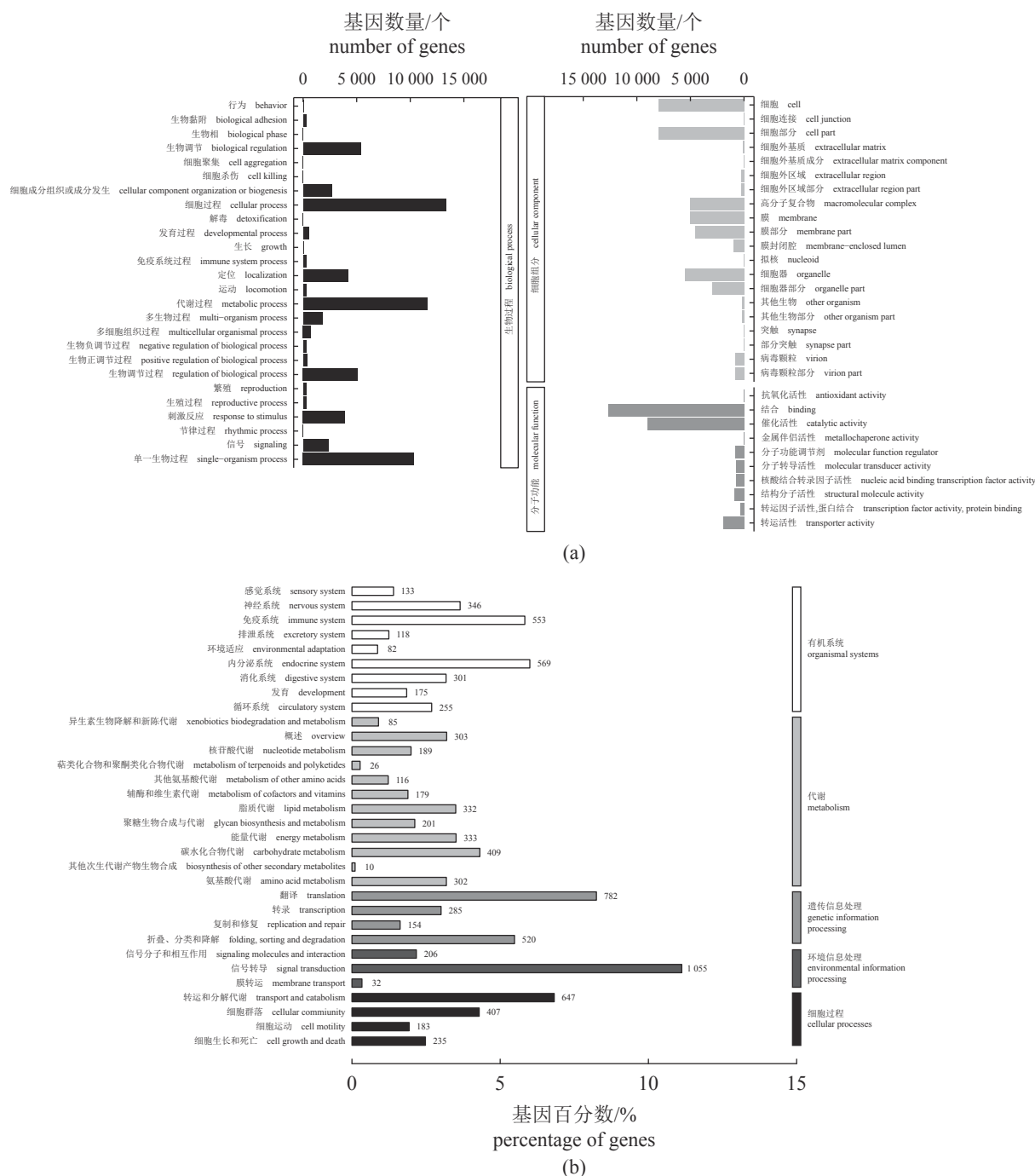


图 2 GO 功能注释和 KEGG 分类注释

(a) 为根据 GO 数据库的功能注释, 纵坐标表示 GO 的分类术语, 横坐标表示基因数量。(b) 为根据 KEGG 数据库的分类注释, 纵坐标代表代谢通路名称, 横坐标代表基因百分数

Fig. 2 Functional classification annotation of GO and KEGG database

(a) is functional classification annotation of GO database, ordinate represents the classification terms for GO, abscissa represents the number of genes. (b) is functional classification annotation of KEGG database, ordinate represents the name of the metabolic pathway, abscissa represents the percentage of genes

变化发现, 盐度 5、10 和 15 组显著下调的通路分别是核糖体通路、军团杆菌病通路和军团杆菌病通路, 而显著上调的通路仅 2 个, 为盐度 10 组中的药物代谢-其他酶通路和嘧啶代谢通路(表 4)。

3 讨论

盐度变化可直接影响水产动物的生长、能量代谢、抗逆性能、抗病力等^[8, 30-31], 机体大量基因

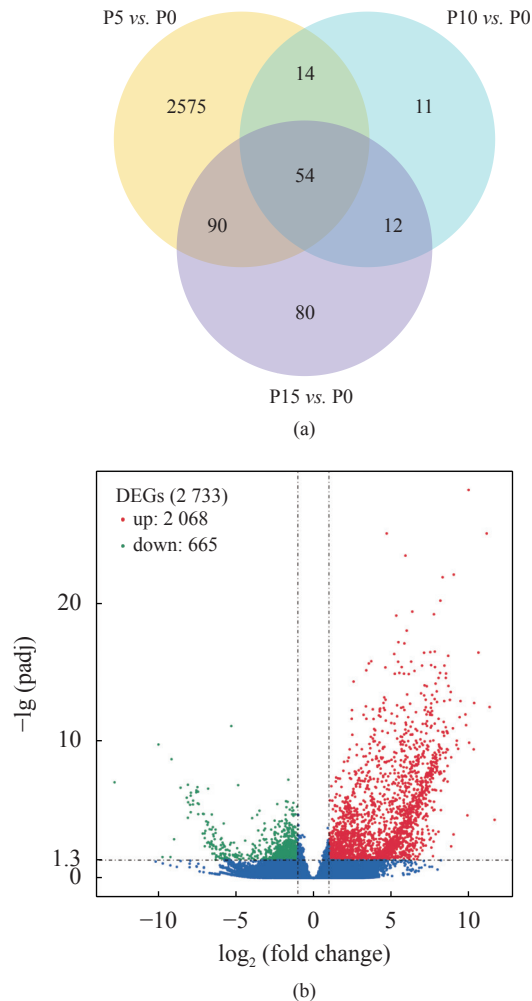


图3 基因表达差异分析

(a) 为不同盐度养殖的红螯光壳螯虾肠道差异表达基因的韦恩图。P0. 盐度 0 组, P5. 盐度 5 组, P10. 盐度 10 组, P15. 盐度 15 组。(b) 为盐度 5 组与盐度 0 组相比, 差异表达基因火山图, 横坐标代表基因在不同实验组中表达倍数变化, 纵坐标代表基因表达量变化的统计学显著程度, 校正后的 P -value (padj) 越小, 则 $-\lg(\text{padj})$ 越大, 差异越显著。蓝色代表无显著差异的基因, 红色代表有显著差异的上调基因, 绿色代表有显著差异的下调基因

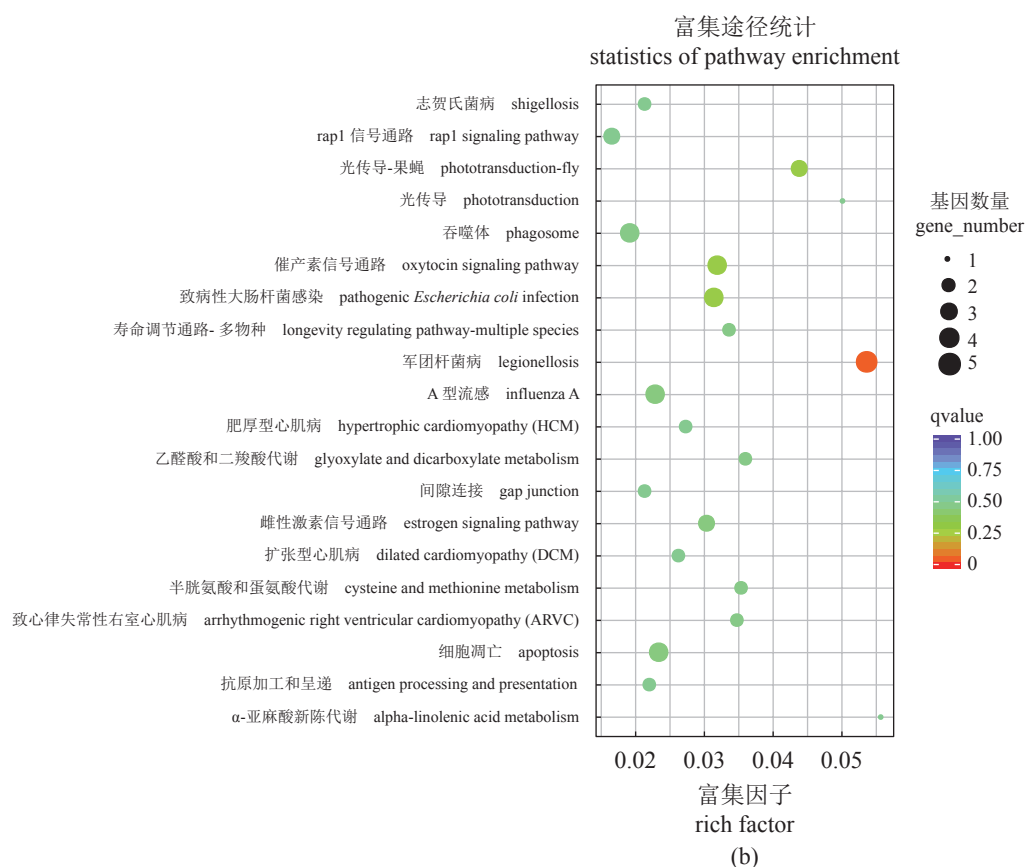
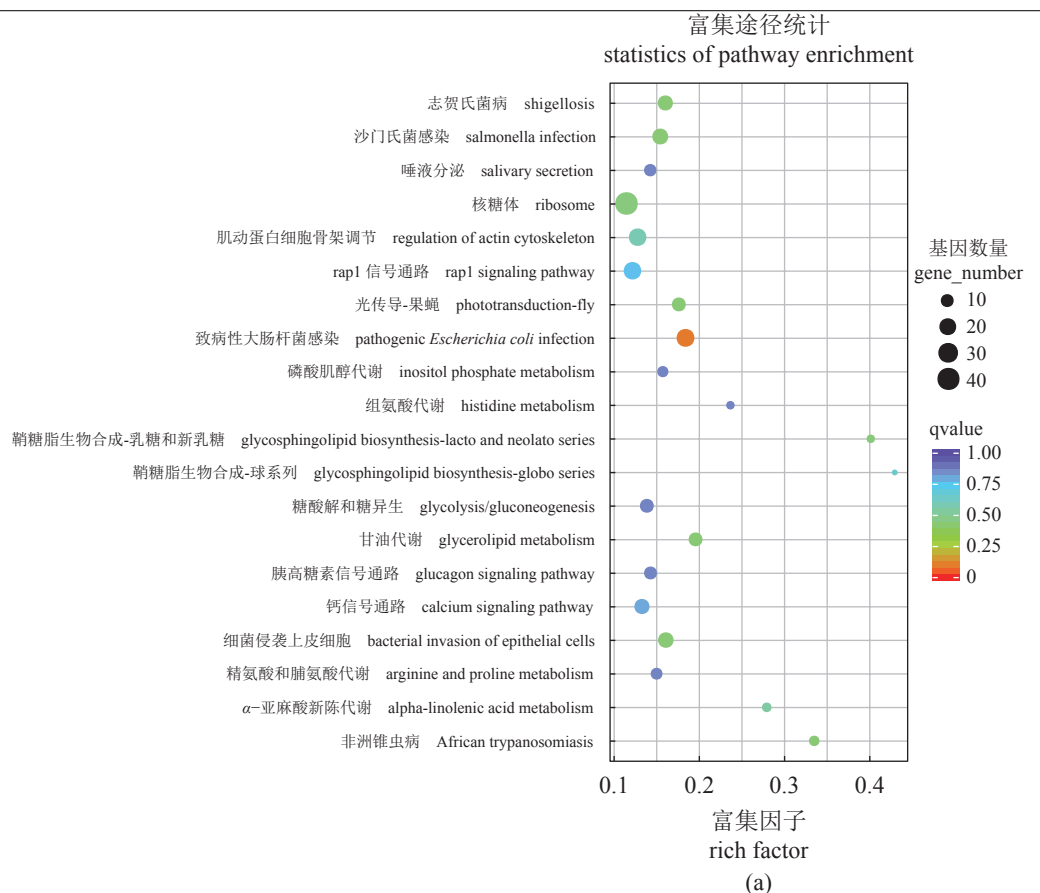
Fig. 3 Analysis of differential gene expression

(a) shows the Venn diagram of differential expression genes of intestinal of *C. quadricarinatus* cultured under different salinity. P0. 0‰ group, P5. 5‰ group, P10. 10‰ group, P15. 15‰ group. (b) shows the volcano plot of differentially expressed genes between the 5‰ group and the 0‰ group. The X axis represents the multiple changes of gene expression in different experimental groups, the Y axis represents the statistical significance degree of gene expression changes. The corrected P -value (padj) is smaller with the more significant of $-\lg(\text{padj})$. Blue represents genes with no significant difference, red represents genes with significant upregulation and green with significant downregulation

和代谢通路会在盐度胁迫过程中显著响应。本研究通过转录组测序技术分析了不同盐度胁迫下红

螯光壳螯虾肠道的基因表达模式, 测序准确度达到 99.97%, 通过基因表达水平分析、表达差异分析以及通路富集分析等综合探究红螯光壳螯虾肠道组织的基因和代谢通路响应^[32-33]。盐度 5、10 和 15 组相比对照组, 分别获得 2 733、91 和 236 个差异基因, 这些基因可能参与红螯光壳螯虾肠道组织应对盐度胁迫的生理调控过程。

盐度胁迫会导致细胞内盐度的改变, 可能会使某些蛋白质变性, 进而对机体产生网络响应, 其中最显著的是抑制红螯光壳螯虾肠道的应激反应和蛋白质合成活动。盐度 10 和 15 组军团杆菌病通路中 Heat Shock 70 ku Protein 1 (*HSPA1s*) 和 Elongation Factor 1-alpha (*eEF1 α*) 基因显著下调。*HSPA1s* 基因编码热敏蛋白 70 (HSP70), HSP70 在维持热敏性蛋白质的结构稳定和功能发挥方面有着重要作用^[34]。此外, *HSPA1s* 基因也参与雌激素信号通路, 在盐度 10 和 15 组, 红螯光壳螯虾肠道中雌激素信号通路活跃度下调但并不显著, 原因可能是在盐度 10 和 15 的养殖环境下, *HSPA1s* 基因的下调主要导致肠道应激能力降低, 相比于对性腺的性激素分泌影响更显著。*eEF1 α* 基因编码延长因子 (elongation factor 1, EF1A) 在肽链延伸阶段与三磷酸鸟苷 (GTP) 结合后再与特异的氨酰-tRNA 结合并运送至核糖体 A 位点, 对核糖体蛋白质合成具有重要作用^[35]。*eEF1 α* 基因的下调提示盐度胁迫影响了核糖体蛋白的合成途径, 这与盐度 5 组红螯光壳螯虾肠道的 KEGG 通路变化结果相同。虽然盐度 5 组未见显著下调的 KEGG 通路, 但排在变化首位的是核糖体通路, 涉及差异基因多达 42 个。与对照组相比, *HSPA1s* 和 *eEF1 α* 基因随着盐度升高表达量均下降, 在盐度 10 和 15 组显著下降。此外, 编码 B 细胞产生的 IgM 和 IgG 蛋白的 Immunoglobulin Heavy Chain (*IGH*) 基因、编码单核巨噬细胞产生白细胞介素 1 细胞因子的 Interleukin 1 Beta (*IL1B*) 和编码刺激活化 B 细胞增殖分泌抗体的白细胞介素 6 细胞因子 Interleukin 6 (*IL6*) 基因, 均在盐度 5 组显著下调且富集在潜在致病菌相关通路中, 揭示较低盐度环境可以通过下调相关炎症基因, 避免环境胁迫导致的过度应激反应以及潜在致病菌产生的免疫损伤。因此, 盐度胁迫对红螯光壳螯虾肠道影响最显著的响应为应激反应调控及蛋白合成活动, 而较低盐度环境可以下调炎症相关基因, 以避免过度应激以及免疫损伤。



(图 4 Fig. 4)

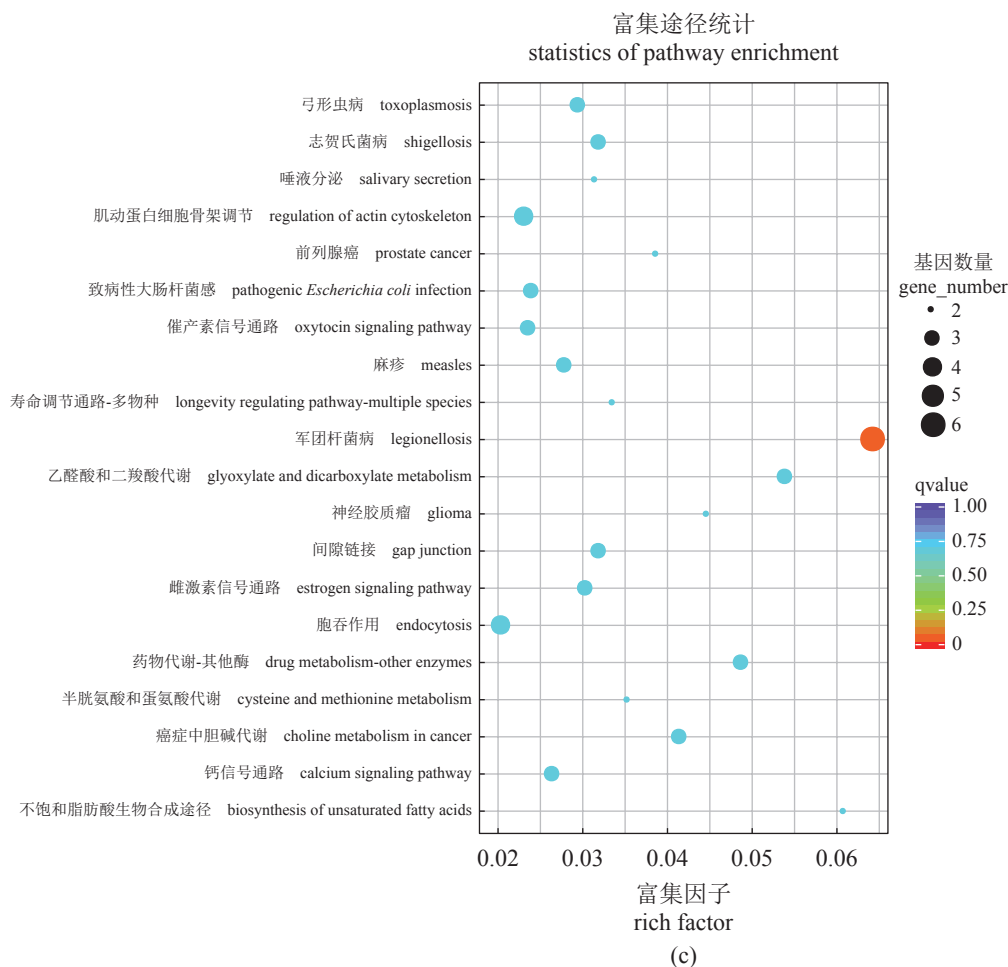


图4 KEGG 通路富集分析

盐度 5 组 (a)、盐度 10 组 (b) 和盐度 15 组 (c) 相比于盐度 0 组差异基因的 KEGG 通路富集情况。当 $qvalue < 0.05$ 时, 认为该功能存在显著富集情况, 且 $qvalue$ 越小 (越接近红色) 越显著富集

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

KEGG pathway enrichment of the 5‰ group (a), 10‰ group (b) and 15‰ group (c) compared with that of the 0‰ group. q values less than 0.05 is determined as significant. Smaller q values (close to red) indicate more significant enrichment

动物机体在受到来自外界不利因素的刺激而产生应激反应时, 体内 DNA 复制和传递过程中易出现 DNA 双链结构破坏、DNA 链断裂、碱基或碱基对被切除或替换等 DNA 损伤^[36]。本研究发现, *HSPA1s*、*eEF1a*、*udp* (uridine phosphorylase)、*UPP* (uridine phosphorylase)、*ACTB_G1* (Actin beta/gamma 1)、*TUBA* (tubulin alpha)、*TUBB* (tubulin beta)、*PFN* (profilin) 等基因在红螯光壳螯虾肠道响应盐度胁迫过程中具有重要的调控作用。*UPP* 和 *udp* 均是嘧啶补救合成途径的一种关键性调节酶基因, 对维持和调控组织中尿嘧啶核苷的浓度起着至关重要的作用^[37]。相对于盐度 5 和 15 组, 盐度 10 组中由 *UPP* 和 *udp* 主要介导的药物代谢-其他酶通路和嘧啶代谢通路显著上调。盐度 10 和 15 组

中 *UPP* 和 *udp* 表达量均显著上调, 表明盐度可以刺激红螯光壳螯虾肠道 *UPP* 和 *udp* 基因表达, 当处于盐度胁迫时, 机体启动嘧啶补救合成途径。*ACTB_G1* 是肌动蛋白 γ 1 的编码基因, 肌动蛋白具有为细胞提供机械支持, 并提供通过细胞质的运输途径以帮助细胞迁移等功能^[38]。*TUBA* 和 *TUBB* 分别是 α 微管蛋白和 β 微管蛋白的编码基因, 微管蛋白对保持细胞形状、运动、胞内物质运输以及 DNA 分离具有不可或缺的作用^[39]。与对照组相比, 处理组的 *ACTB_G1*、*TUBA* 和 *TUBB* 这 3 个基因表达量均显著下调, 表明盐度胁迫不仅影响细胞形状结构, 还会影响胞内物质运输及 DNA 复制与修复等。此外, *PFN* 是骨架蛋白结合蛋白编码基因, 主要参与调控肌动蛋白骨架的重

表 4 不同盐度养殖条件下 KEGG 通路变化情况

Tab. 4 Changed KEGG pathways at different salinities revealed by RNA-sequencing

组别 group	信号通路 pathway	主要差异基因 major differentially expressed genes
盐度5组 (上调) 5‰ group (up-regulated)	志贺氏菌病 (12, 0.109) Shigellosis	<i>CTTN, EMS1, WAS, ITGB1, CD29, PFN, ARPC2, ARPC4, ACTB_G1, RHOG</i>
	细菌侵袭上皮细胞 (12, 0.109) bacterial invasion of epithelial cells	<i>CTTN, EMS1, WAS, ITGB1, CD29, ARPC2, ARPC4, CTNNA, ACTB_G1, RHOG</i>
	甘油脂质代谢 (9, 0.109) glycerolipid metabolism	<i>PNLIP, PL, MGLL, AGPAT5, AGPAT6, AGPAT9, DGAT1, MBOAT1_2, AKR1A1, adh, PNLIPRP3, PLRP3, GPAT3_4,</i>
	肌动蛋白细胞骨架调节 (16, 0.165) regulation of actin cytoskeleton	<i>CFL, WAS, ACTB_G1, PFN, ARPC2, ARPC4, PAK1, PAK2, PDGFRA, CD140A, ITGB1, CD29, ENAH, MENA, RDX</i>
	沙门氏菌感染 (11, 0.252) Salmonella infection	<i>WAS, RHOG, PFN, ARPC2, ARPC4, ACTB_G1, FLNA</i>
盐度5组 (下调) 5‰ group (down-regulated)	核糖体 (42, 2.19×10 ⁻⁷) ribosome	<i>RPL4, RPL6, RPL7, RPL10A, RPL13, RPL18A, RPL19, RPL23, RPL23A, RPL27A, RPL28, RPL29, RPL30, RPL34, RPL37A, RPL40, RPLP0, RPLP1, RPLP2, RPSA, RPS2, RPS3, RPS8, RPS12, RPS14, RPS15, RPS16, RPS18, RPS19, RPS21, RPS23, RPS25, RPS27A</i>
	非洲锥虫病 (5, 0.073) African trypanosomiasis	<i>HBB, IL1B, IGH, IL6, HBA</i>
	麻疹 (12, 0.073) measles	<i>HSPA1s, IRF7, IL1B, TNFAIP3, A20, OTUD7C, RACK1, MX1, IGH, ADAR, ADAR1, STAT1, IL6</i>
	军团杆菌病 (10, 0.141) Legionellosis	<i>HSPA1s, EEF1A, IL6, IL1B</i>
	致病性大肠杆菌感染 (12, 0.141) pathogenic Escherichia coli infection	<i>ACTB_G1, TUBA, TUBB, ARPC3, NCL, NSR1</i>
盐度10组 (上调) 10‰ group (up-regulated)	药物代谢-其他酶 (1, 0.011) drug metabolism - other enzymes	<i>udp, UPP</i>
	嘧啶代谢 (1, 0.011) pyrimidine metabolism	<i>udp, UPP</i>
盐度10组 (下调) 10‰ group (down-regulated)	军团杆菌病 (5, 0.049) Legionellosis	<i>HSPA1s, eEF1a</i>
	致病性大肠杆菌感染 (4, 0.270) pathogenic Escherichia coli infection	<i>ACTB_G1, TUBA</i>
	光传导-果蝇 (3, 0.270) phototransduction-fly	<i>ACTB_G1, CALM</i>
	催产素信号通路 (4, 0.270) oxytocin signaling pathway	<i>ACTB_G1, CALM, EEF2</i>
	雌激素信号通路 (3, 0.423) estrogen signaling pathway	<i>HSPA1s, CALM</i>
盐度15组 (上调) 15‰ group (up-regulated)	药物代谢-其他酶 (3, 0.259) drug metabolism - other enzymes	<i>XDH, cdd, CDA udp, UPP</i>
	肌动蛋白细胞骨架调节 (4, 0.269) regulation of actin cytoskeleton	<i>RDX, WAS, PFN, PDGFRA, CD140A</i>
	志贺氏菌病 (3, 0.269) Shigellosis	<i>NFKBIA, WAS, PFN</i>
	前列腺癌 (2, 0.437) prostate cancer	<i>NFKBIA, PDGFRA, CD140A</i>
	癌症中的胆碱代谢 (2, 0.473) choline metabolism in cancer	<i>WAS, PDGFRA, CD140A</i>
盐度15组 (下调) 15‰ group (down-regulated)	军团杆菌病 (5, 0.011) Legionellosis	<i>HSPA1s, eEF1a</i>
	乙醛酸和二羧酸代谢 (3, 0.121) glyoxylate and dicarboxylate metabolism	<i>E4.1.3.1, aceA</i>
	不饱和脂肪酸生物合成途径 (2, 0.280) biosynthesis of unsaturated fatty acids	<i>ELOVL5, ACAA1</i>
	雌激素信号通路 (3, 0.280) estrogen signaling pathway	<i>HSPA1s, CALM</i>
	RNA转运 (4, 0.328) RNA transport	<i>EEF1A, POP5</i>

注: 括号中的数字分别表示差异表达基因的数量和P值

Notes: digits in brackets indicate the number of differentially expressed genes and P value, respectively

塑,在细胞黏附、运动、生长等方面发挥重要作用^[40]。本研究发现随着盐度升高,红螯光壳螯虾肠道的蛋白质合成受到影响,其中影响最广泛的是肌动蛋白和微管蛋白。盐度胁迫通过影响肌动蛋白和微管蛋白的解聚以及结合,进而影响红螯光壳螯虾肠道的细胞形态、细胞内物质运输和细胞内信号转导。然而较高盐度下嘧啶补救合成途径的启动,说明红螯光壳螯虾肠道在主动修复尿嘧啶核苷酸比例失衡导致的DNA损伤^[41]。因此,较高盐度水体(盐度15)不适宜长期养殖红螯光壳螯虾,易造成肠道上皮细胞DNA损伤,并增大肠道细胞形态病变风险。

盐度胁迫不仅影响红螯光壳螯虾肠道细胞DNA复制与修复,对蛋白质、糖、脂肪三大类物质代谢和微量元素代谢也有显著影响。与对照组相比,在处理组发生变化的通路中,Calmodulin(CALM)基因均显著下调。CALM是钙调蛋白的编码基因,钙调蛋白不仅在调控细胞增殖及细胞周期和调节微管解聚方面具有关键作用,在参与调控靶酶活性以及矿物质吸收方面同样不可或缺^[42]。结果揭示盐度胁迫可通过Ca²⁺依赖性信号转导途径下调钙调蛋白的表达,进而影响微管蛋白在微管解聚过程中的钙稳态,使得红螯光壳螯虾肠道细胞形态变形,渗透压失衡和信号转导失常。此外,与盐度5组相比,盐度15组的下调通路还集中在物质代谢相关通路,例如乙醛酸和二羧酸代谢通路、不饱和脂肪酸生物合成途径和RNA转运通路。乙醛酸和二羧酸代谢通路是脂肪转化为糖的相关反应过程,该过程相关基因的下调以及不饱和脂肪酸合成途径受阻暗示脂肪消化和分解过程受到抑制,而这可能是水体盐度通过影响不饱和脂肪酸合成途径的关键酶的mRNA水平的结果^[43-44]。烟酸通过烟酸和烟酰胺代谢通路调节体内烟酰胺单核苷酸的水平,及时修复DNA损伤、调节细胞凋亡、维持氧化还原状态^[45]。而碳水化合物的降解和小分子糖的合成,使得机体内游离氨基酸显著增加,高浓度的游离氨基酸有利于机体抵御盐度胁迫以及细胞的渗透压失衡^[46]。而盐度15组相比盐度5组显著上调的通路分别是烟酸和烟酰胺代谢通路、氨基糖和核苷酸糖代谢通路,证明红螯光壳螯虾通过上调微量元素代谢来应对盐度胁迫导致的DNA损伤,以及促进大分子碳水化合物的降解和小分子糖类物质的合成,从而维持细胞的渗透压平衡。可见红螯光壳螯虾在盐度

胁迫下,机体主要通过上调物质代谢相关通路来应对环境胁迫造成的DNA损伤以及细胞渗透压失衡。

综上所述,红螯光壳螯虾肠道响应盐度胁迫主要表现在抑制应激反应调节以及蛋白质合成活动。盐度10和15的胁迫对蛋白质合成活动中影响最大的是肌动蛋白和微管蛋白。机体通过启动嘧啶补救合成途径主动修复尿嘧啶核苷酸比例失衡导致的DNA损伤,以及大分子碳水化合物的降解和小分子糖类物质的合成来维持细胞渗透压。本研究初步阐明红螯光壳螯虾在盐度胁迫条件下潜在的适应性机制,为进一步研究红螯光壳螯虾肠道调控机制提供分子基础,为红螯光壳螯虾的半咸水养殖奠定理论基础,并提供可靠的生物学资料。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献(References):

- [1] 李喜莲,郭建林,黄振远,等.红螯光壳螯虾转录组高通量测序及分析[J].四川农业大学学报,2019,37(2):241-246,265.
Li X L, Guo J L, Huang Z Y, et al. Sequencing and analysis of the transcriptome of *Cherax quadricarinatus*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2019, 37(2): 241-246,265 (in Chinese).
- [2] Karplus I, Zoran M, Milstein A, et al. Culture of the Australian red-claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in Israel: III. Survival in earthen ponds under ambient winter temperatures[J]. *Aquaculture*, 1998, 166(3-4): 259-267.
- [3] Medley P B, Nelson R G, Hatch L U, et al. Economic feasibility and risk analysis of Australian red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* aquaculture in the south-eastern United States[J]. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1994, 25(1): 135-146.
- [4] Prymaczok N C, Medesani D A, Rodríguez E M. Levels of ions and organic metabolites in the adult freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*, exposed to different salinities[J]. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 2008, 41(2): 121-130.
- [5] Prymaczok N C, Chaulet A, Medesani D A, et al. Survival, growth, and physiological responses of advanced juvenile freshwater crayfish (*Cherax quadricarinatus*),

- reared at low temperature and high salinities[J]. *Aquaculture*, 2012, 334-337: 176-181.
- [6] Liu S B, Qi C L, Jia Y Y, *et al.* Growth and intestinal health of the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, reared under different salinities[J]. *Aquaculture*, 2020, 524: 735256.
- [7] 顾志敏, 许谷星, 黄鲜明, 等. 红螯螯虾的室内人工育苗[J]. 水产学报, 2003, 27(1): 32-37.
- Gu Z M, Xu G X, Huang X M, *et al.* Indoor artificial breeding and juvenile nursing of *Cherax quadricarinatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2003, 27(1): 32-37 (in Chinese).
- [8] 吕晓燕, 李嘉尧, 方燕, 等. 亚硝酸盐对红螯光壳螯虾不同组织免疫相关酶活性及超微结构的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1812-1820.
- Lü X Y, Li J Y, Fang Y, *et al.* Nitrite stress on immune-related enzymes and the ultrastructure in different tissue of redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12): 1812-1820 (in Chinese).
- [9] Prymaczok N C, Pasqualino V M, Viau V E, *et al.* Involvement of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in the physiological compensation of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* to low temperature and high salinity stress[J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2016, 186(2): 181-191.
- [10] AbuDalo M, El-khateeb M, Ayadi H, *et al.* First assessment of water quality of an artificial lake for fish culture and irrigation: a case study of water reuse in water shortage area across the Middle East[J]. *Aquaculture Research*. 2021; 52(3): 1267-1281.
- [11] Tan J L, Kang Y H. Changes in soil properties under the influences of cropping and drip irrigation during the reclamation of severe salt-affected soils[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(10): 1228-1237.
- [12] Hamed Y. Soil structure and salinity effects of fish farming as compared to traditional farming in northeastern Egypt[J]. *Land Use Policy*, 2008, 25(3): 301-308.
- [13] Ghosh T K, Chauhan Y H, Mandal R N. Growth performance of *Labeo bata* (Hamilton, 1822) in freshwater and its acclimatization in brackish water with betaine as feed additive[J]. *Aquaculture*, 2019, 501: 128-134.
- [14] Venâncio C, Castro B B, Ribeiro R, *et al.* Sensitivity to salinization and acclimation potential of amphibian (*Pelophylax perezi*) and fish (*Lepomis gibbosus*) models[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 172: 348-355.
- [15] Rida R, Zein-Eddine R, Kreydiyyeh S, *et al.* Influence of salinity on survival, growth, hemolymph osmolality, gill sodium potassium ATPase activity, and sodium potassium chloride co-transporter expression in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 2021, 52(2): 466-474.
- [16] 乔雁冰, 李世顺, 崔文博, 等. 急性盐度胁迫对克氏原螯虾抗氧化和非特异性免疫性能的影响[J]. *中国渔业质量与标准*, 2020, 10(2): 44-50.
- Qiao Y B, Li S S, Cui W B, *et al.* Effects of acute salinity on antioxidation and non-specific immunity of *Procambarus clarkii*[J]. *Chinese Fishery Quality and Standards*, 2020, 10(2): 44-50 (in Chinese).
- [17] Duan Y F, Wang Y, Ding X, *et al.* Response of intestine microbiota, digestion, and immunity in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to dietary succinate[J]. *Aquaculture*, 2020, 517: 734762.
- [18] Wong M K S, Ozaki H, Suzuki Y, *et al.* Discovery of osmotic sensitive transcription factors in fish intestine via a transcriptomic approach[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1134.
- [19] 杨静雯, 周演根, 黄铭, 等. 盐度对虹鳟和硬头鳟幼鱼消化酶和抗氧化酶活性的比较研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2019, 49(3): 119-128.
- Yang J W, Zhou Y G, Huang M, *et al.* Comparative studies on digestive and antioxidant enzyme activities between juvenile rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and steelhead trout (*O. mykiss*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2019, 49(3): 119-128 (in Chinese).
- [20] Suo Y T, Li E C, Li T Y, *et al.* Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 63: 87-96.
- [21] 邓素贞, 韩兆方, 陈小明, 等. 大黄鱼高温适应的转录组学分析[J]. 水产学报, 2018, 42(11): 1673-1683.
- Deng S Z, Han Z F, Chen X M, *et al.* Transcriptome analysis of high-temperature adaptation in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(11): 1673-1683 (in Chinese).
- [22] 李喜莲, 郭建林, 李倩, 等. 红螯螯虾转录组中的SSR位点信息分析[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(7): 207-211.

- Li X L, Guo J L, Li Q, *et al.* The information analysis of SSR loci in the red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) transcriptome[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2020, 59(7): 207-211 (in Chinese).
- [23] Wu D L, Huang Y H, Chen Q, *et al.* Effects and transcriptional responses in the hepatopancreas of red claw crayfish *Cherax quadricarinatus* under cold stress[J]. *Journal of Thermal Biology*, 2019, 85: 102404.
- [24] Ali M Y, Pavasovic A, Mather P B, *et al.* Transcriptome analysis and characterisation of gill-expressed carbonic anhydrase and other key osmoregulatory genes in freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*[J]. *Data in Brief*, 2015, 5: 187-193.
- [25] 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.
- [26] Götz S, García-Gómez J M, Terol J, *et al.* High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(10): 3420-3435.
- [27] Mortazavi A, Williams B A, McCue K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(7): 621-628.
- [28] Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(10): R106.
- [29] Mao X Z, Cai T, Olyarchuk J G, *et al.* Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary[J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(19): 3787-3793.
- [30] Paital B, Chainy G B N. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2010, 151(1): 142-151.
- [31] Xie S W, Wei D, Yin P, *et al.* Dietary replacement of fish-meal impaired protein synthesis and immune response of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* at low salinity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2019, 228: 26-33.
- [32] Tan F Q, Tu H, Liang W J, *et al.* Comparative metabolic and transcriptional analysis of a doubled diploid and its diploid citrus rootstock (*C. junos* cv. Ziyang xiangcheng) suggests its potential value for stress resistance improvement[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15: 89.
- [33] Bai B, Wu J, Sheng W T, *et al.* Comparative analysis of anther transcriptome profiles of two different rice male sterile lines genotypes under cold stress[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(5): 11398-11416.
- [34] Clerico E M, Tilitsky J M, Meng W L, *et al.* How HSP70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2015, 427(7): 1575-1588.
- [35] Sasikumar A N, Perez W B, Kinzy T G. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 2012, 3(4): 543-555.
- [36] 冉茂良, 高环, 尹杰, 等. 氧化应激与DNA损伤[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(10): 2238-2245.
- Ran M L, Gao H, Yin J, *et al.* Oxidative stress and DNA injury[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(10): 2238-2245 (in Chinese).
- [37] 李润花, 祝建疆, 殷国荣. 脊椎动物和寄生虫尿苷磷酸化酶的研究进展[J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2014, 32(6): 465-468.
- Li R H, Zhu J J, Yin G R. Research progress on uridine phosphorylase in vertebrate and parasites[J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2014, 32(6): 465-468 (in Chinese).
- [38] 刘妍, 潘丽, 秦贵信. 肌动蛋白结构及生物学功能的研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(1): 34-38.
- Liu Y, Pan L, Qin G X. Advances in structure and biological function of actin[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2020, 56(1): 34-38 (in Chinese).
- [39] Knossow M, Campanacci V, Khodja L A, *et al.* The mechanism of tubulin assembly into microtubules: insights from structural studies[J]. *iScience*, 2020, 23(9): 101511.
- [40] Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes[J]. *Trends in Cell Biology*, 2004, 14(8): 461-469.
- [41] Hyde J E. Targeting purine and pyrimidine metabolism in Human apicomplexan parasites[J]. *Current Drug Targets*, 2007, 8(1): 31-47.
- [42] 李庆伟, 张撼, 逢越. 钙调蛋白结构、性质及其细胞生物学功能的研究进展[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学)*

- 版), 2017, 40(1): 74-82.
- Li Q W, Zhang H, Pang Y. The structure, properties and cellular biological functions of CaM[J]. *Journal of Liaoning Normal University (Natural Science Edition)*, 2017, 40(1): 74-82 (in Chinese).
- [43] 谢帝芝, 王树启, 游翠红, 等. 鱼类高度不饱和脂肪酸合成的影响因素及其机理[J]. *中国水产科学*, 2013, 20(2): 456-466.
- Xie D Z, Wang S Q, You C H, *et al.* Influencing factors and mechanisms on HUFA biosynthesis in teleosts[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2013, 20(2): 456-466 (in Chinese).
- [44] Hou D M, Jia T, Li Q, *et al.* Metabonomics of white adipose tissue and brown adipose tissue in *Tupaia belangeri* during cold acclimation[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part D: Genomics and Proteomics*, 2021, 38: 100823.
- [45] Abdullah K M, Alam M M, Iqbal Z, *et al.* Therapeutic effect of vitamin B₃ on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced diabetic rat model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 105: 1223-1231.
- [46] 付萍, 吕建建, 刘萍, 等. 盐度胁迫对三疣梭子蟹肌肉和血淋巴中游离氨基酸含量的影响[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 374-381.
- Fu P, Lü J J, Liu P, *et al.* Effects of different salinity level on free amino acid composition in muscle and hemolymph of the swimming crab *Portunus trituberculatus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 374-381 (in Chinese).

Analysis of genes and metabolic pathways in response to long-term salinity stress in red crayfish (*Cherax quadricarinatus*)

LIU Shubin¹, XU Chang^{1*}, JIA Yongyi², GU Zhimin², LI Erchao^{1*}

(1. Key Laboratory of Tropical Hydrobiology and Biotechnology of Hainan Province, Hainan Aquaculture Breeding Engineering Research Center, College of Marine Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: In order to explore the effect of salinity stress on the intestinal gene expression level of *Cherax quadricarinatus*, Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing platform was used to conduct bidirectional sequencing of intestinal tissues of *C. quadricarinatus* under different salinity conditions (0, 5, 10 and 15 psu). After quality control and assembly of the obtained raw data, 76 534 unigenes was obtained. Blast in NR, NT, KO, Swissprot, PFAM, GO and KOG databases, 37 378 unigenes could be annotated. The amount of gene expression was estimated according to FPKM (Fragments Per Kilo bases Per Million Fragments). Based on the protein annotation results of NR and Pfam databases, 448 362 unigenes were functional annotation. According to the relationship between KO functional annotation and Pathway, 9 483 unigenes were annotated and classified into 34 pathways. Gene expression differences were analyzed by DEGseq. 0 psu was used as the control group, and the screening conditions for significantly different genes were set as Q value<0.05 and multiple |Fold Change|>2. The 5, 10 and 15 psu groups obtained 2 733, 91 and 236 differentially expressed genes respectively, among which 2 068 genes were significantly up-regulated and 665 genes were significantly down-regulated, with the 5 psu group having the most differentially expressed genes. The KEGG pathway enrichment analysis of all differentially expressed genes showed that 5, 10 and 15 psu groups were enriched to 265, 80 and 120 pathways respectively, and only 10 psu and 15 psu groups had a significantly enriched pathway respectively, all of which were legionella pathways. After identification, legionella pathway was significantly down-regulated, which was consistent with the previous results of enterobacteriaceae. The results showed that red chelicerae could protect the intestinal tract from infection by exogenous pathogenic bacteria by inhibiting the relevant pathways and abundance of potential pathogenic bacteria under the condition of increased salinity. In addition, changing in differential genes (*eEF1 α* , *udp*, *UPP*, *ACTB_G1*, *TUBA*, *TUBB*, *PFN*, *CALM*) suggest that increased salinity seriously affects the cellular morphology, intracellular material transport, and intracellular signal transduction in the gut of red chelicerae, and activates pyrimidine remediation pathways to repair genetic damage caused by uracil nucleotide imbalance. The results provide important reference materials for the saline-alkali or brackish aquaculture of *C. quadricarinatus* in the future, and provide reference for the further study of the intestinal immune regulation mechanism of *C. quadricarinatus* under salinity stress.

Key words: *Cherax quadricarinatus*; hypersaline stress; intestine; high-throughput sequencing; differential expression analysis

Corresponding authors: XU Chang. E-mail: cxu@hainanu.edu.cn;

LI Erchao. E-mail: ecli@bio.ecnu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program of China (2018YFD0901305); Initial Fund from Hainan University for R & D (KYQD[ZR]1924)