



青海湖裸鲤盐碱耐受过程中的渗透、免疫、代谢相关基因筛选和分析

张海琛, 马清花, 许保可, 阿琳林, 梁健*

(青海大学生态环境工程学院, 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要: 为探究青海湖裸鲤在盐碱耐受过程中的基因表达变化, 对青海湖河口水域以及入湖淡水河——泉吉河中的青海湖裸鲤的鳃、肾脏组织进行转录组测序, 筛选青海湖裸鲤耐盐碱过程中发挥作用的免疫、代谢、渗透相关基因。结果显示, 使用 Trinity 对所有样本质控数据 (clean data) 进行从头组装后共得到 541 429 个非冗余的序列 (unigene), N50 平均长度达 612 bp。经差异表达分析发现, 共有 832 个基因在 2 个区域中的青海湖裸鲤鳃、肾脏中共表达。经 GO 功能注释分析, 注释到结合 (binding)、细胞过程 (cellular process)、代谢过程 (metabolic process)、单一生物过程 (single-organism process) 的 DEGs 占比较多。KEGG 通路分析结果表明, 与免疫、代谢、渗透相关的通路得到了富集。根据差异表达基因的 GO 注释和 KEGG 信号通路富集分析, 实验初步筛选到了青海湖裸鲤渗透相关基因, 主要包括钠/钾转运 ATP 酶 (sodium/potassium-transporting, ATPase)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase)、溶质载体家族 (solute carrier family) 等; 免疫相关基因主要包括白细胞介素 (interleukin)、补体 (complement)、整合素 (integrin) 等; 代谢相关基因主要有一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase)、1, 25-二羟基维生素 D(3) 24-羟化酶 (1, 25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase)、细胞色素 P450 (cytochrome P450) 等。本实验为青海湖裸鲤的组学研究提供了相关数据, 同时也为青海湖裸鲤在盐碱耐受方面的适应性研究奠定了基础。

关键词: 青海湖裸鲤; 转录组测序; 盐碱耐受; 差异表达基因

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

青海湖是我国面积最大的内陆咸水湖泊, 湖水 pH 为 9.1~9.4, 26~32 mmol/L, 盐度为 11.9~13.49 g/L, 是世界上海拔最高的咸水湖之一, 其独特的自然生态环境造就了独特的高寒生态系统^[1-2]。青海湖裸鲤 (*Gymnocypris przewalskii*) 俗称湟鱼、无鳞鱼等, 属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 裸鲤属 (*Gymnocypris*), 可以在高海拔的缺氧

环境中生长繁殖, 生命力强, 是青海湖重要的经济鱼类, 处于青海湖整个生态系统的核心地位^[3-4]。青海湖裸鲤属溯河性产卵鱼类, 每年的 4—8 月为其产卵繁殖期, 6 月中旬达到其产卵盛期。产卵时从青海湖溯游到淡水支流布哈河、泉吉河等水流缓慢的河滩道, 完成产卵后又洄游到青海湖内。同时青海湖裸鲤在洄游过程中先是面临着盐碱度

收稿日期: 2021-05-07 修回日期: 2021-10-10

资助项目: 国家自然科学基金 (31960741); 青海省科技项目 (2016-ZJ-940Q)

第一作者: 张海琛 (照片), 从事动物生态学研究, E-mail: orange9605@163.com

通信作者: 梁健, 从事生物化学与分子生物学研究, E-mail: liangjianws@126.com



的下降, 在回到青海湖过程中又面临着盐碱度的升高^[5], 表现出极强的盐碱适应性和耐受性。我国盐碱水资源丰富, 但绝大部分的水生生物对于水中盐碱度的变化比较敏感。高盐度会改变水生生物的渗透压, 高碱度会损伤水生生物 DNA^[6]、消化酶及免疫相关酶活性下降^[7]、耗氧率升高^[8]等。同时, 盐度、碱度和 pH 对水生生物的生长、代谢、繁殖等方面表现出交互协同作用^[9]。转录组测序作为研究复杂转录组变化的强有力工具, 可用于物种中尤其是那些基因组未知的物种中的基因发现和分子信号通路的鉴定, 而目前关于青海湖裸鲤在盐碱度耐受转录组学方面的研究仍然比较少。本研究中, 对青海湖裸鲤在青海湖河口水域(有一定盐碱度)和淡水下的鳃、肾组织进行转录组测序, 并通过比较分析筛选出在盐碱耐受过程中发挥作用的渗透、免疫、代谢相关基因, 同时为青海湖裸鲤在盐碱胁迫下的基因表达水平变化研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用青海湖裸鲤取样于青海湖及其周边水系, 从同一时期(5—7月)的淡水(无胁迫处理, 青海省海北藏族自治州刚察县泉吉河, 99.89° E, 37.24° N)以及青海湖与哈尔盖河口(盐碱环境胁迫, pH 9.58, 盐度为 6, 碱度 3.22 mmol/L, 100.42° E, 37.12° N)处分别收集 3 尾青海湖裸鲤(3~4 龄, 体长 200~300 mm, 体重 100~150 g)。获得裸鲤样品后将鱼立即处死, 快速分离其鳃组织和肾脏组织, 并储存于液氮中备用。本研究获得了青海大学实验动物管理和使用伦理委员会批准, 实验过程中操作人员严格遵守伦理规范, 并按照青海大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 RNA 提取和文库构建

使用 TRIzol 法参照说明书分别从 2 个采样地的青海湖裸鲤鳃组织和肾脏组织中提取总 RNA, 然后用 DNase I (TaKaRa, 日本) 去除基因组 DNA。通过使用 NanoPhotometer-NP80 (Implen, 德国) 对 RNA 的浓度和纯度进行检测, 1% 琼脂糖凝胶电泳用于测量 RNA 的完整性。

转录组文库的制备及测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。使用 Oligo(dT) 的磁珠从总 RNA 中分离出具有 poly(A) 的 mRNA, 进行纯

化, 用 fragmentation buffer 将其片段化(100~400 bp), 并使用随机引物反转录成第一链 cDNA, 然后通过添加缓冲液、dNTPs、DNA 聚合酶 I 和 RNase H 合成双链 cDNA。使用 AMPure XP beads 再次纯化双链 cDNA。首先对纯化的双链 cDNA 进行末端修复, 加 A 尾并连接到测序接头, 然后使用 AMPure XPbeads 进行片段大小的选择。最后进行 PCR 扩增, 并使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物以获得最终的 cDNA 文库。构建好文库后, 使用 Qubit 2.0 进行初步定量, 并将文库稀释至 1.5 ng/μL。然后使用 Agilent 2100 检测文库的插入片段大小(insert size)。通过实时荧光定量 PCR 技术(qRT-PCR)方法准确定量文库的有效浓度(文库有效浓度 > 2 nmol/L)以确保文库质量。最后基于 Illumina HiSeq 2000 测序平台, 以 Paired-end 双末端测序技术完成转录组测序。

1.3 数据拼接和功能注释

由于原始测序数据中会包含测序接头序列、低质量读段、N (N 表示不确定碱基信息) 率较高序列及长度过短序列, 这将严重影响后续分析的质量。因此在分析之前需先对测序所得的原始数据进行统计和质控, 从而得到高质量的质控数据(clean data)以保证后续分析结果的准确性, 然后将质控后得到的有效数据(clean reads)使用 Trinity 软件^[10]进行无参转录组从头组装。使用 Blast X 程序将 unigenes 与六大数据库(NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库)进行比对($E < 10^{-5}$), 获得在各数据库的注释信息, 并对其在各数据库的注释情况进行统计。

1.4 差异表达基因(DEGs)分析

本实验根据 FPKM (每千个碱基的转录每百万映射读取的片段) 方法评估基因的表达量。使用基于负二项分布的 DESeq2 软件对 raw counts 进行统计分析, 以 $P\text{-adjust} < 0.05$ & $|\log_2FC| \geq 2$ 作为筛选条件以获得比较组间差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 为了控制整体推断结果发生错误的概率或频次, 使用 BH (Benjamini hochberg) 方法对统计检验获得的 $P\text{-value}$ 进行矫正, 然后对样本间差异表达基因 DEGs 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。分别将注释、富集到 GO term 和 KEGG 通路中的基因进行筛选, 获得渗透、免疫、代谢相关基因。使用 Cytoscape 软件进行网络的可视化分析, 通过计算节点

权重以及节点的连通度, 筛选可能的关键基因。

1.5 qRT-PCR 分析

为验证 RNA-Seq 数据, 使用 qRT-PCR 分析随机选择的具有不同功能的差异基因的组织表达特异性。使用 Primer premier 5 软件和在线引物设计网站 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 对所选差异表达基因设计引物 (表 1)。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, 美国) 从青海湖水域和淡水泉吉河的青海湖裸鲤鳃、肾脏组织中提取总 RNA。在测量

提取的 RNA 的完整性和浓度后, 使用 Prime Script™ RT-PCR 试剂盒 (TaKaRa, 日本) 反转录为 cDNA。以 β -actin 为内参, 使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TliRNase H Plus) 试剂盒 (TaKaRa, 日本), 在 Roche LightCycler 480 (Roche, 瑞士) 上进行 qRT-PCR 检测。反应程序为 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s (40 个循环)。最后使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ [11] 方法计算基因的相对表达量, 且 C_T 值为各样品 3 个生物学重复的平均值。

表 1 实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiments

基因 ID gene ID	基因 genes	引物序列(5'-3') primer sequences
TRINITY_DN262851_c1_g1	<i>slc 41a1</i>	F: TTCAAGCCAGTCGAATCTCC R: CCTCTGAGCCAAAGAACGAG
TRINITY_DN270913_c1_g1	<i>nka-a1</i>	F: CTTCAGGTACATTAGCGACA R: CCTTCTTAATTCTCTCCGTGA
TRINITY_DN271314_c1_g1	<i>cpne2</i>	F: TTTGCCTCTACTGTGCGTTT R: CCATTAGCCAGAATCAGTGGTC
TRINITY_DN233551_c1_g3	<i>zg16</i>	F: TACTCATACTCCCCTGCTGT R: CTCCTTTTCATTGCCATAAG
TRINITY_DN252580_c0_g1	<i>gimap7</i>	F: TACAACGAATGGTGTCTGAA R: ATTTGTCCAAATGAGTCCTG
TRINITY_DN273767_c5_g1	<i>c3</i>	F: CCTCATCATCTACCTGGACAAGATT R: GATAAAACCTCACACACCGATTTTC
TRINITY_DN248282_c1_g3	<i>noxal</i>	F: GAGTTGATCAAGCTGTGGGATG R: GTGTGCAAGCAACCACAAACAT
TRINITY_DN231329_c1_g5	<i>nkcr2b4</i>	F: CTGTGTGCTCAACAATCCCATC R: GTTTCTTGCAGATGCAGCACAT
TRINITY_DN231329_c1_g5	<i>nos</i>	F: TGGATTCCATCTCCAGAAGAC R: CACCCAAATAGCAGTGTATGG
TRINITY_DN252673_c0_g2	<i>nf7</i>	F: CTACGAAATGGCAACTCAGACG R: GGCATACAGGGCATATCTGTGA
TRINITY_DN238088_c0_g1	<i>traf2</i>	F: AAGAGACAAGATGCCATTGCTG R: ACTCGTTCCTCTCATCACCACA
TRINITY_DN247441_c0_g2	<i>tnf223</i>	F: ACTCTCCACTGCAACCACACAT R: TGTCCCACAGTTGGCTATTGAC
TRINITY_DN244206_c0_g1	<i>muc17</i>	F: CTGAAAGACACCTTCGAGACCA R: GTTGACAGGACACTTTGAGCACT
TRINITY_DN268488_c0_g1	<i>S100A1</i>	F: GCAATGGAAGGCCTGATTAAG R: TCCACAATCATGGGGTCTTTAC
TRINITY_DN263758_c3_g2	cell cycle control protein 50B	F: GAATCACAGAGGGGATTATGC R: GACCACACAAATGAGCCAACCT
TRINITY_DN255498_c0_g1	<i>rasl10B</i>	F: ATATGTGGAGTGCTCTGCCAAG R: TCACATTAGGACACAACGCTCTC

2 结果

2.1 测序数据组装及质控

本研究分别提取了青海湖水域和淡水泉吉河中的青海湖裸鲤鳃、肾脏组织的总 RNA, 获得并构建了 12 个相应的 cDNA 文库, 同时采用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术对其转录组进行了测序。青海湖水域获得的青海湖裸鲤鳃、肾脏组织分别编号为 B 和 E, 淡水泉吉河中获得的青海湖裸鲤鳃、肾脏组织编号为 C、F。各样品质控

数据 (clean data) 均达到 6.74 Gb 以上, Q30 碱基百分比在 94.38% 以上 (表 2)。使用 Trinity 对所有样本 clean data 进行从头组装, 将对组装结果进行优化评估, 结果显示, 组装得到的转录本 (transcript) 个数为 880 998, 以聚类最长的转录本为 unigene, 其个数为 541 429, N50 (组装获得的 unigene 按长度排列, 累加达到总 unigene 长度的一半时所对应的 unigene 的长度) 平均长度为 612 bp。其中长度为 0~500 bp 的 unigenes 共有 404 000 个, 占比最大, 占总 unigenes 的 75% (图 1)。

表 2 测序数据统计表

Tab. 2 Statistics table of sequencing data

组织 tissues	分组 groups	样本 samples	原始数据/个 raw reads	原始碱基/bp raw bases	有效数据/个 clean reads	有效碱基/bp clean bases	错误率/% error	测序质量值大于20的碱基比例/% Q20	测序质量值大于30的碱基比例/% Q30	GC含量/% GC content
鳃 gill	Haergai river mouth (RM)	B1	46 246 466	6 936 969 900	45 851 920	6 755 774 262	0.012	98.18	94.59	46.81
		B2	56 196 968	8 429 545 200	55 735 764	8 199 457 948	0.012	98.19	94.63	46.76
		B3	55 177 584	8 276 637 600	54 620 580	8 036 330 087	0.012	98.09	94.38	46.55
	fresh water (FW)	C1	50 635 508	7 595 326 200	50 157 128	7 382 417 171	0.012	98.10	94.39	46.62
		C2	58 535 590	8 780 338 500	58 005 660	8 541 739 490	0.012	98.16	94.57	45.96
		C3	50 745 132	7 611 769 800	50 303 796	7 414 218 133	0.012	98.27	94.83	47.33
肾脏 kidney	Haergai river mouth (RM)	E1	58 913 564	8 837 034 600	58 348 016	8 582 581 913	0.012	98.09	94.39	45.78
		E2	51 715 248	7 757 287 200	51 245 502	7 546 342 050	0.012	98.14	94.50	47.00
		E3	54 532 114	8 179 817 100	54 079 146	7 967 514 297	0.012	98.17	94.59	46.36
	fresh water (FW)	F1	65 148 466	9 772 269 900	64 575 450	9 517 076 277	0.012	98.24	94.75	47.78
		F2	51 889 196	7 783 379 400	51 392 018	7 566 092 711	0.012	98.19	94.63	47.64
		F3	49 733 560	7 460 034 000	49 343 774	7 326 693 514	0.011	98.71	96.00	47.18

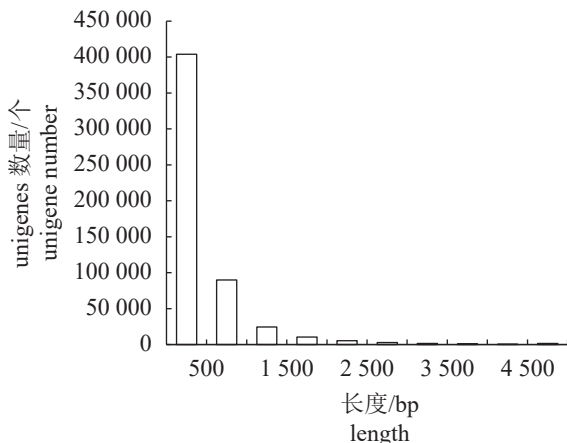


图 1 青海湖裸鲤 unigenes 的长度分布

Fig. 1 Unigene Sequence Length distribution of *G. przewalskii*

2.2 转录组注释

将经质控后获得的 unigenes 与 6 大数据库 (NR、Swiss-Prot、Pfam、COG、GO 和 KEGG 数据库) 进行比对, 获得在各数据库的注释信息, 并对其在各数据库的注释情况进行统计。共有 107 568 个 unigenes 得到了注释, 注释率为 19.87%。其中有 97 816 个 unigenes 注释到了 NR 库, 注释率为 18.07%; 68 226 个 unigenes 注释到了 Swiss-Prot 库, 注释率为 12.6%; 46 459 个 unigenes 注释到了 Pfam 库, 注释率为 8.58%; 16 894 个 unigenes 注释到了 COG 库, 注释率为 3.12%; 13 560 个 unigenes 注释到了 GO 库, 注释率为 2.5%; 51 153 个 unigenes 注释到了 KEGG 库, 注释率为 9.45% (图 2)。拼接所得的 unigene 与 NR 蛋白数据

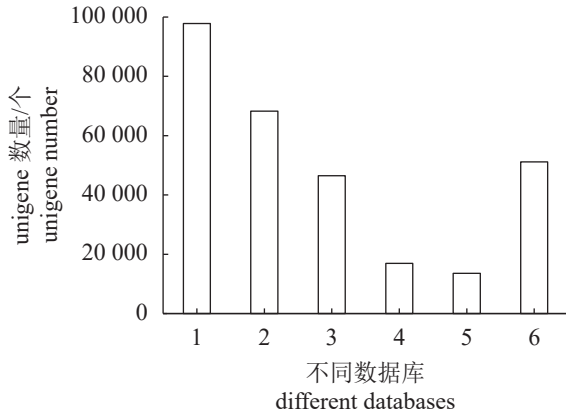


图2 不同数据库注释结果

1. NR 数据库, 2. Swiss-Prot 数据库, 3. Pfam 数据库, 4. COG 数据库, 5. GO 数据库, 6. KEGG 数据库。

Fig. 2 Annotated results of different databases

1. annotated in NR, 2. annotated in Swiss-Prot, 3. annotated in Pfam, 4. annotated in COG, 5. annotated in GO, 6. annotated in KEGG.

库进行同源性比对, 相似序列所占比例最高的几种物种分别是鲤 (*Cyprinus carpio*, 21.42%)、犀角金线鲃 (*Sinocyclocheilus rhinoceros*, 17.01%)、安水金线鲃 (*S. anshuiensis*, 14.32%)、滇池金线鲃 (*S. grahami*, 13.26%)、中华菊头蝠 (*Rhinolophus sinicus*, 5.39%)、斑马鱼 (*Danio rerio*, 4.71%) (图3)。

2.3 差异表达基因

利用 DEseq 2 软件分析 2 个区域的青海湖裸鲤鳃、肾脏中差异表达的基因。结果显示, 共有 832 个基因在 2 个区域的组织中共表达, 3 269 个基因仅在鳃中 (B vs. C) 表达, 其中表达上调的 DEGs 共 2 403 个, 下调的 1 698 个; 4 281 个基因仅在肾脏 (E vs. F) 中表达, 其中表达上调的 DEGs 共 3 506 个, 下调的 1 607 个。

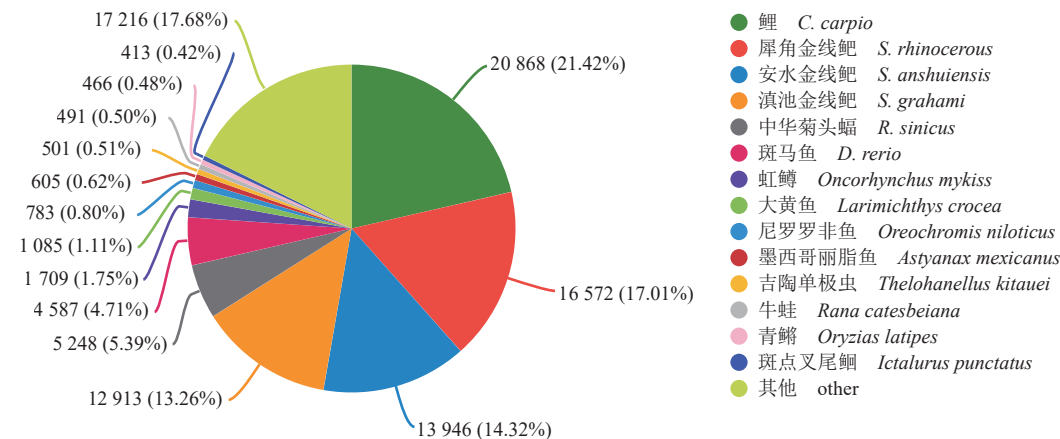


图3 NR 注释物种分布

Fig. 3 NR annotated species distribution of *G. przewalskii*

2.4 差异表达基因的 GO 功能分类分析

本研究中, GO 功能注释分析结果表明共有 4 101 (B vs. C) 和 5 113 (E vs. F) 个差异表达基因分别注释到了 GO 的 3 大分类中, 即生物过程、细胞组分和分子功能。其中, B vs. C 和 E vs. F 中注释到结合 (binding) 的 DEGs 数量最多, 分别为 226 个和 261 个。其次为细胞过程 (cellular process), 注释到该 GO term 的 DEGs 分别为 239 个和 232 个。注释到代谢过程 (metabolic process) 的 DEGs 分别为 226 个和 194 个, 而注释到单一生物过程 (single-organism process) 的 DEGs 分别为 190 个和 207 个 (图4)。此外, B vs. C 和 E vs. F 分别有 20、13 个 DEGs 注释到了免疫系统过程 (immune system process) GO term。

2.5 差异表达基因的 KEGG 通路分析

2 个区域的差异表达基因在 KEGG 不同的通路中出现不同程度的富集。B vs. C 中共富集到 307 条通路, 其中显著富集的通路主要集中在癌症 (pathways in cancer)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-akt signaling pathway)、癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、黏着斑 (focal adhesion)、核糖体 (ribosome)、人 T 细胞白血病病毒 1 感染 (human T-cell leukemia virus 1 infection)、甲型流感 (influenza A)、阿米巴原虫病 (amoebiasis)、癌症中的 MicroRNAs (MicroRNAs in cancer)、细胞因子和细胞因子受体相互作用 (cytokine-cytokine receptor interaction) (图 5-a)。部分基因富集到了吞噬体 (phagosome)、ABC 转运蛋白 (ABC transporters)、IL-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、补

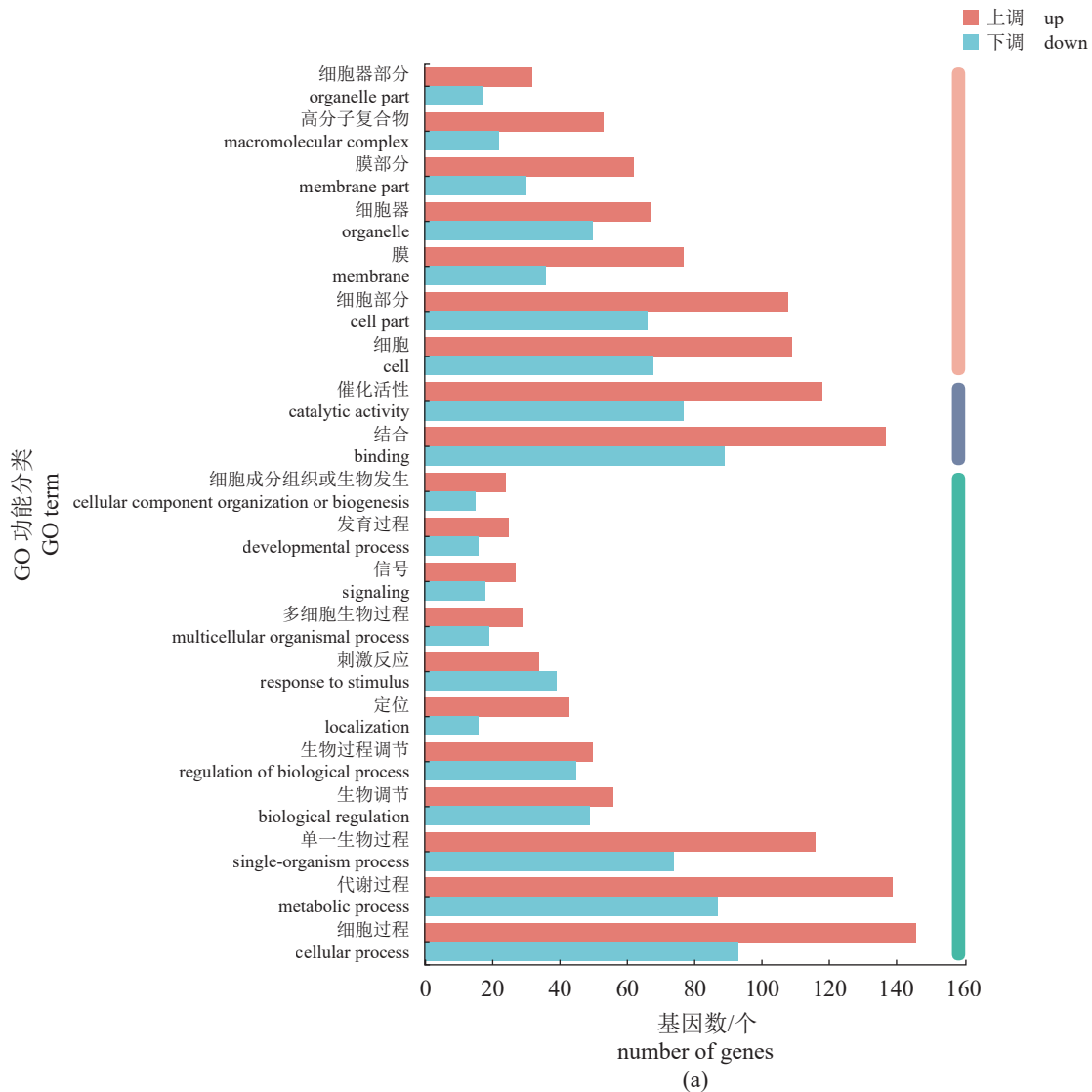
体和凝血级联 (complement and coagulation cascades)、造血细胞系 (hematopoietic cell lineage)、精氨酸和脯氨酸代谢 (arginine and proline metabolism)、色氨酸代谢 (tryptophan metabolism)、果糖和甘露糖代谢 (fructose and mannose metabolism) 等与渗透、免疫和代谢相关的信号通路 (表 3)。

E vs. F 中共富集到 303 条通路, 显著富集的通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、癌症 (pathways in cancer)、癌症中的蛋白多糖 (proteoglycans in cancer)、Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway)、肌动蛋白细胞骨架的调节 (regulation of actin cytoskeleton)、黏着斑 (focal adhesion)、癌症中的 MicroRNAs (MicroRNAs in cancer)、吞噬体 (phagosome)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、轴突引导 (axon

guidance)(图 5-b)。同样, 有部分基因富集到了矿物质吸收 (mineral absorption)、近端小管碳酸氢盐再生 (proximal tubule bicarbonate reclamation)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway)、白细胞跨内皮迁移 (leukocyte transendothelial migration)、补体和凝血级联 (complement and coagulation cascades)、造血细胞系 (hematopoietic cell lineage)、精氨酸合成 (arginine biosynthesis)、泛酸和辅酶 A 生物合成 (pantothenate and CoA biosynthesis) 等与渗透、免疫、代谢相关的信号通路 (表 4)。

2.6 鳃组织渗透、免疫、代谢相关基因筛选

根据差异表达基因的 GO 注释和 KEGG 信号通路富集分析, 然后使用 Cytoscape 软件, 进行网络的可视化分析, 通过计算节点权重以及节点的



(图 4 Fig. 4)

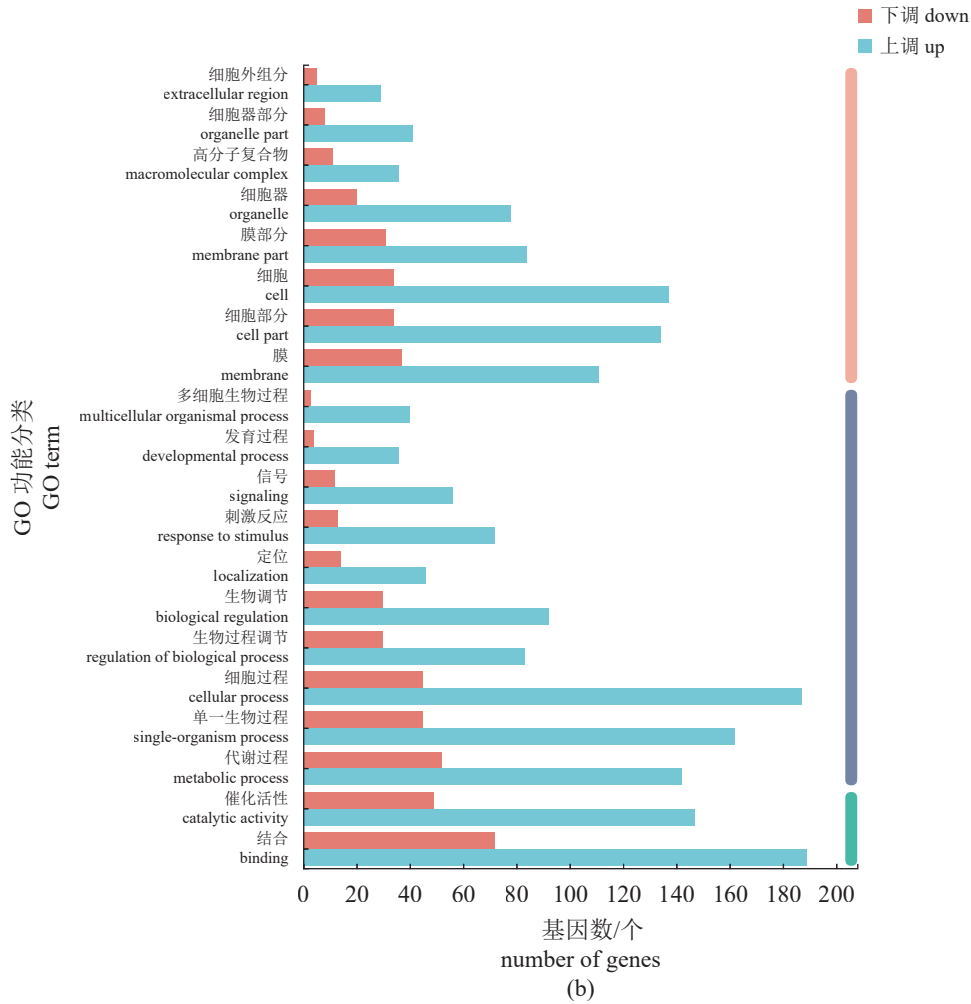


图 4 差异表达基因的 GO 功能注释分类图

(a) B vs. C; (b) E vs. F 左边纵坐标表示 GO 的二级分类, 横坐标表示包含在该二级分类中的 unigene/transcript 的数目, 右边三种颜色由上到下分别表示 GO 的 3 大分支 (即生物过程、细胞组分和分子功能)。

Fig. 4 Classification of differentially expressed genes in three GO categories in *G. przewalskii*

The ordinate on the left represents the secondary classification of GO, the abscissa represents the number of unigene/transcript included in the secondary classification, and the three colors on the right represent the three major branches of GO (ie BP, CC, MF) from top to bottom.

连通度, 我们筛选到的青海湖裸鲤渗透相关的基因则主要有丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase)、瞬时受体电位阳离子通道 (transient receptor potential cation channel subfamily)、囊性纤维化跨膜 (cystic fibrosis transmembrane)、氯通道蛋白 (chloride channel protein) 等。免疫相关基因主要包括补体 (complement)、整合素 (integrin)、白细胞介素 (interleukin)、颗粒酶 B (granzyme B) 等。代谢相关的基因主要有乙醇脱氢酶 (aldehyde dehydrogenase)、1, 25-二羟基维生素 D(3)24-羟化酶 (1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase)、3-磷酸肌醇

合酶 (inositol-3-phosphate synthase)、细胞色素 P450 (cytochrome P450)、果糖二磷酸醛缩酶 C (fructose-bisphosphate aldolase C) 等 (附表 1)。

2.7 肾组织渗透、免疫、代谢相关基因筛选

筛选得到的青海湖裸鲤肾脏组织渗透相关蛋白包括溶质载体家族 (solute carrier family)、钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase)、瞬时受体电位阳离子通道 (transient receptor potential cation channel subfamily)、氯通道蛋白 (chloride channel protein)、钠/钾转运 ATP 酶 (sodium/potassium-transporting ATPase) 等。免疫相关基因主要有整合素 (integ-

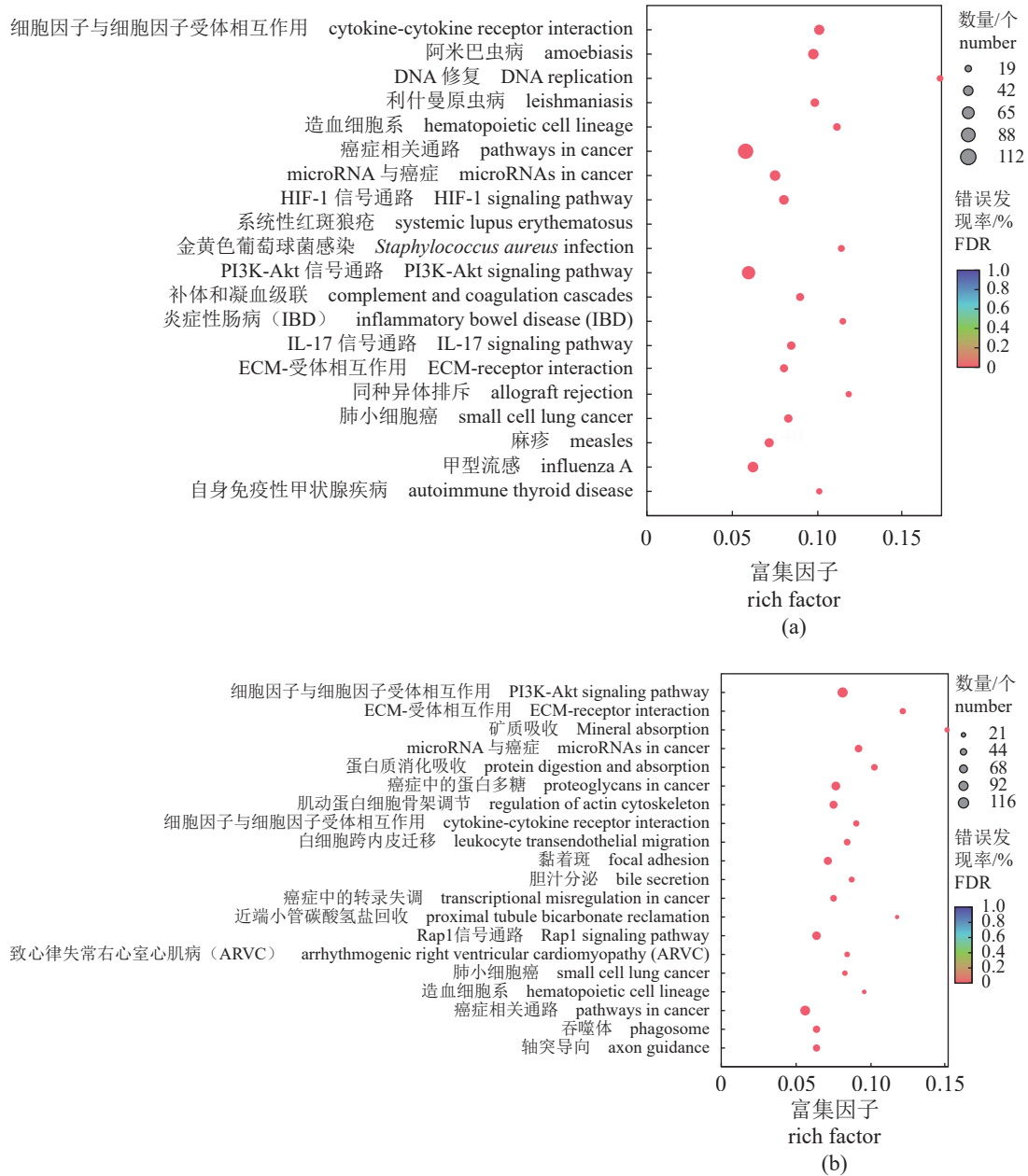


图 5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG classification of putative functions of differentially expressed genes

(a) B vs. C; (b) E vs. F.

rin)、干扰素诱导蛋白 VLIG 蛋白亚家族 (interferon-induced very large GTPase)、颗粒酶 B (granzyme B)、白细胞介素 (interleukin)、补体 (complement)。代谢相关基因则包括一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase)、1, 25-二羟基维生素 D(3)24-羟化酶 (1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase)、6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2, 6-双磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3)、细胞色素 P450 (cytochrome P450)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase)、磷酸甘

油酸变位酶 (phosphoglycerate mutase) 等 (附表 2)。

2.8 qRT-PCR 结果

为验证转录组测序数据结果的可靠性, 从上述 2 个区域的实验数据分析结果中随机挑选 16 个基因进行 qRT-PCR, 检测差异表达基因的表达情况, 并将该结果与转录组测序结果进行比较 (图 6)。结果表明, 所挑选的基因表达量与转录组测序结果趋势一致, 从而验证了转录组测序结果的可靠性。

表 3 鳃组织渗透、免疫、代谢相关信号通路

Tab. 3 Osmotic, immune, metabolism related pathway in gill

分类 groups	通路ID term_ID	通路名称 term name	基因数目 number of genes	P值 P-value
渗透 osmotic	map04145	吞噬体 phagosome	61	1.523×10 ⁻³
	map00190	氧化磷酸化 oxidative phosphorylation	4	8.613×10 ⁻³
	map02010	ABC转运蛋白 ABC transporters	3	5.961×10 ⁻³
	map05012	帕金森病 Parkinson disease	3	1.933×10 ⁻²
	map05010	阿尔茨海默病 Alzheimer disease	3	4.925×10 ⁻²
	map05340	原发性免疫缺陷 primary immunodeficiency	2	1.307×10 ⁻²
	map04966	集合管酸分泌 collecting duct acid secretion	2	2.026×10 ⁻²
免疫 immune	map05322	系统性红斑狼疮 systemic lupus erythematosus	34	1.203×10 ⁻⁵
	map04657	IL-17 信号通路 IL-17 signaling pathway	34	3.765×10 ⁻⁵
	map04610	补体和凝血级联 complement and coagulation cascades	31	3.289×10 ⁻⁵
	map04640	造血细胞系 hematopoietic cell lineage	28	3.555×10 ⁻⁶
	map05323	类风湿关节炎 rheumatoid arthritis	28	2.971×10 ⁻³
	map04664	Fc ε RI 信号通路 Fc epsilon RI signaling pathway	23	1.273×10 ⁻²
	map05321	炎症性肠病 inflammatory bowel disease (IBD)	21	3.439×10 ⁻⁵
	map05330	同种异体移植排斥 allograft rejection	19	5.332×10 ⁻⁵
	map05320	自身免疫性甲状腺病 autoimmune thyroid disease	19	4.643×10 ⁻⁵
	map05340	原发性免疫缺陷 primary immunodeficiency	13	1.201×10 ⁻³
	map04672	IgA产生的肠道免疫网络 intestinal immune network for IgA production	13	4.342×10 ⁻³
	map05310	气喘 asthma	12	6.106×10 ⁻⁴
	map04623	胞质DNA感应通路 cytosolic DNA-sensing pathway	10	3.326×10 ⁻²
	代谢 metabolism	map04931	胰岛素抗性 insulin resistance	35
map04933		糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	33	9.311×10 ⁻⁴
map00330		精氨酸和脯氨酸代谢 arginine and proline metabolism	22	7.590×10 ⁻³
map00380		色氨酸代谢 tryptophan metabolism	18	4.866×10 ⁻³
map00051		果糖和甘露糖代谢 fructose and mannose metabolism	18	1.018×10 ⁻²
map00590		花生四烯酸代谢 arachidonic acid metabolism	16	7.644×10 ⁻³
map00140		类固醇激素生物合成 steroid hormone biosynthesis	15	7.101×10 ⁻⁴
map00830		视黄醇代谢 retinol metabolism	13	2.677×10 ⁻²
map00100		类固醇生物合成 steroid biosynthesis	10	6.331×10 ⁻³
map00533		糖胺聚糖生物合成-硫酸角质素 glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	8	1.584×10 ⁻²
map00524		新霉素、卡那霉素和庆大霉素生物合成 neomycin, kanamycin and gentamicin biosynthesis	5	3.202×10 ⁻²

3 讨论

水体环境中盐碱度含量的变化使得鱼类通过改变自身的生理状态以调节体内渗透压平衡来维持体内环境的稳态^[12]。鱼类渗透压调节变化的过程中,同时还伴随着鱼体免疫功能的变化以及能量的大量消耗^[13]。

鳃是鱼类主要的呼吸器官,因具有表面积大和与外界水环境直接接触的特点而被认为在水分

运输和离子转运中起主要作用^[14],且对水体环境的变化高度敏感。此外,鳃组织所分泌的黏液也是鱼体抵抗环境病原微生物入侵和扩散的有力方式。鳃上皮组织中含有大量的上皮组织细胞,内含有丰富的Na⁺-K⁺-ATP酶。鱼类能通过鳃组织上的泌氯细胞来调节体内Na⁺、Cl⁻以及体液渗透平衡。在高渗环境下鱼类还可以通过肾脏的肾小管重吸收作用,增强对水和离子的重吸收能力^[15],从而维持体内环境的稳态。同时,肾脏作为鱼类

表 4 肾组织渗透、免疫、代谢相关信号通路

Tab. 4 Osmotic, immune, metabolism related pathway in kidney

分类 group	通路ID term_ID	通路名称 term name	基因数目 gene numbers	P值 P-value
渗透 osmotic	map04145	吞噬体 phagosome	61	1.523×10 ⁻³
	map04974	蛋白质消化吸收 protein digestion and absorption	7	1.114×10 ⁻⁷
	map04978	矿物质吸收 mineral absorption	6	5.121×10 ⁻⁸
	map04976	胆汁分泌 bile secretion	6	9.813×10 ⁻⁷
	map04260	心肌收缩 cardiac muscle contraction	6	1.132×10 ⁻⁶
	map04964	近端小管碳酸氢盐回收 proximal tubule bicarbonate reclamation	5	5.625×10 ⁻⁶
	map04960	醛固酮调节的钠重吸收 aldosterone-regulated sodium reabsorption	5	5.996×10 ⁻⁶
	map04973	碳水化合物消化吸收 carbohydrate digestion and absorption	5	8.442×10 ⁻⁷
	map04961	内分泌和其他因子调节的钙重吸收 endocrine and other factor-regulated calcium reabsorption	5	5.337×10 ⁻⁶
	map04971	胃酸分泌 gastric acid secretion	5	2.733×10 ⁻⁵
	map04918	甲状腺激素合成 thyroid hormone synthesis	5	4.003×10 ⁻⁵
	map04911	胰岛素分泌 insulin secretion	5	4.916×10 ⁻⁵
	map04972	胰腺分泌物 pancreatic secretion	5	7.292×10 ⁻⁵
	map04919	甲状腺激素信号通路 thyroid hormone signaling pathway	5	7.686×10 ⁻⁵
	map04970	唾液分泌 salivary secretion	5	9.525×10 ⁻⁵
	map04261	心肌细胞中的肾上腺素能信号 adrenergic signaling in cardiomyocytes	5	3.669×10 ⁻⁴
	map04022	cGMP-PKG信号通路 cGMP-PKG signaling pathway	5	4.776×10 ⁻⁴
	map04024	cAMP 信号通路 cAMP signaling pathway	5	1.138×10 ⁻³
	map00190	氧化磷酸化 oxidative phosphorylation	3	1.206×10 ⁻²
	map04977	维生素消化吸收 vitamin digestion and absorption	2	3.981×10 ⁻³
	map05323	类风湿关节炎 rheumatoid arthritis	2	3.759×10 ⁻²
	map05120	幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号传导 epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	2	4.013×10 ⁻²
	map05110	霍乱弧菌感染 <i>Vibrio cholerae</i> infection	2	4.865×10 ⁻²
免疫 immune	map04670	白细胞跨内皮迁移 leukocyte transendothelial migration	51	6.209×10 ⁻⁶
	map04610	补体和凝血级联 complement and coagulation cascades	27	4.695×10 ⁻³
	map04640	造血细胞系 hematopoietic cell lineage	24	6.942×10 ⁻⁴
代谢 metabolism	map04933	糖尿病并发症中的AGE-RAGE信号通路 AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	30	3.385×10 ⁻²
	map00220	精氨酸合成 arginine biosynthesis	13	4.633×10 ⁻²
	map00770	泛酸和辅酶A生物合成 pantothenate and CoA biosynthesis	9	2.254×10 ⁻²
	map00532	糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮肤素 glycosaminoglycan biosynthesis-chondroitin sulfate/dermatan sulfate	7	9.241×10 ⁻³

主要的免疫器官, 在盐碱耐受过程中同样发挥着重要的作用。水环境中盐碱度的增加, 导致鱼体抗病能力下降易受到水体中病原微生物的侵入, 在此过程中肾脏上的免疫相关因子的含量就会发生相应的变化以应对外界环境的刺激。

通过转录组测序分析发现, 青海湖裸鲤盐碱耐受的过程很复杂, 从 KEGG 通路分析来看, 既涉及到癌症相关的通路 (pathway in cancer)、又有信号转导的过程, 如 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-

Akt signaling pathway)、还包括蛋白多糖 (proteoglycans in cancer) 的变化等, 故我们从渗透、免疫和代谢这 3 个方面探讨盐碱耐受过程中发生作用的相关基因。

3.1 转录组测序分析

本研究通过无参转录组高通量测序技术, 比较分析了盐碱水环境和淡水环境下青海湖裸鲤鳃、肾脏 2 个组织转录组以及差异基因的表达情况。

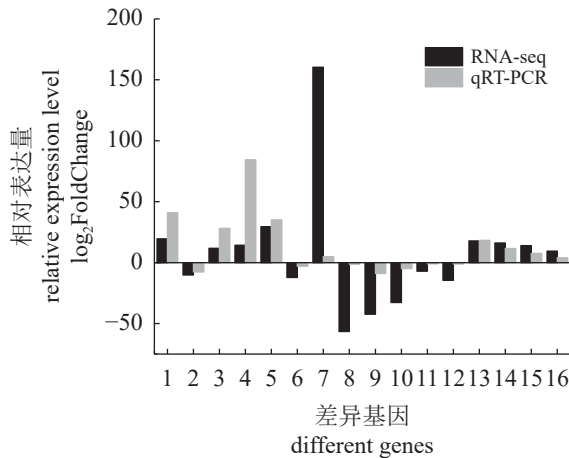


图6 差异表达基因的qRT-PCR检测RNA-Seq结果

1. 溶质载体家族41成员1基因, 2. 钠/钾转运ATP酶亚基 α -1基因, 3. 钙依赖膜结合蛋白基因, 4. 酶原颗粒膜蛋白16基因, 5. GTPase IMAP家族成员7基因, 6. 补体C3基因, 7. NADPH氧化酶激活剂1基因, 8. 自然杀伤细胞受体2B4基因, 9. 一氧化氮合酶基因, 10. 核因子7基因, 11. TNF受体相关因子2基因, 12. 环指蛋白233基因, 13. 黏蛋白-17基因, 14. S100蛋白-A1基因, 15. 细胞周期调控蛋白, 16. ras样蛋白家族成员10B基因。

Fig. 6 Detection of RNA-seq by qRT-PCR of differentially expressed genes

1. solute carrier family 41 member 1, 2. sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1, 3. copine-2, 4. zymogen granule membrane protein 16, 5. GTPase IMAP family member 7, 6. complement C3, 7. NADPH oxidase activator 1, 8. natural killer cell receptor 2B4, 9. nitric oxide synthase, 10. nuclear factor 7, 11. TNF receptor-associated factor 2, 12. RING finger protein 223, 13. mucin-17, 14. protein S100-A1, 15. cell cycle control protein 50B, 16. ras-like protein family member 10B.

转录组结果分析表明, 所构建的12个cDNA文库中, 各样品clean data均达到6.74 Gb以上, 且Q30碱基百分比在94.38%以上。使用Trinity对所有样本clean data进行从头组装, 共得到541 429个unigene, 其中共有107 568个unigenes得到了注释, 注释率为19.87%。本实验转录组测序结果注释率不高, 这可能是由于目前的几大公共数据库中所记录到的与青海湖裸鲤相近的物种基因注释信息较少的原因。NR数据库比对注释的结果显示, 有97 816个unigenes注释到了NR库, 注释率为18.07%, 其中与鲤(21.42%)的同源性比对最高, 其次为犀角金线鲃(17.01%)、安水金线鲃(14.32%)和滇池金线鲃(13.26%), 这可能是由于青海湖裸鲤与鲤、金线鲃属鱼类同为鲤科鱼类, 也反映了青海湖裸鲤与金线鲃属鱼类具有很近的亲缘关系^[3-4]。

3.2 渗透相关基因的筛选及分析

由于鱼类生活在水体中, 故其在整个生命过

程中常常会面临水环境渗透压的改变。维持体液平衡是一个复杂的过程, 涉及到了各种渗透调节器官, 主要包括鳃、消化道、肾脏等^[16]。在海水适应(鱼类生活环境从淡水向海水过渡)和淡水适应(鱼类生活环境从海水向淡水过渡)过程中, 鱼类分别通过吞饮海水、减少尿量、排出离子和停止饮水, 增加尿量, 降低鳃上皮氯化钠排出, 从水环境中吸收 Na^+ 和 Cl^- 等方式来调节渗透压^[17-19]。本研究中肾脏组织中筛选得到的渗透相关基因种类多于鳃组织, 表明青海湖裸鲤肾组织在渗透胁迫中也发挥了重要作用。许多细胞的细胞膜表明都分布有 Na^+ - K^+ -ATP酶(Na^+ - K^+ -ATPase, NKA), 这是离子转运过程中起关键作用的酶, 具有调节体内 Na^+ 、 Cl^- 以及体液渗透平衡的功能。 Na^+ - K^+ -ATPase可以通过水解产生能量进行 Na^+ 、 K^+ 之间的互换, 同时也为其他离子转运供能, 以此来维持体内渗透压的稳定, 并为细胞运输提供能量^[12, 20]。已有大量研究表明, 鱼类NKA对外界环境渗透压的变化会随着其生态位的改变而有所改变。在对莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)^[21]、青鳉^[22]、尼罗罗非鱼^[23]等的研究中均发现, 处于高渗环境下的NKA活性增加, 而低渗环境下的NKA的活性则最低。本研究中筛选所得的NKA的表达同样也符合这一规律, 肾脏中筛选出的NKA其表达量同样为盐碱胁迫环境高于淡水环境。而本研究未在鳃组织中筛选出NKA, 这可能是由于盐碱胁迫下青海湖裸鲤免疫能力的下降从而使得鳃组织NKA表达量过低而未被筛选到, 也可能是NKA在鳃和肾组织中发挥的作用并不相同, 需要进一步研究。有研究表明^[24], 胞内第二信使cAMP浓度可随着盐度的升高而增加, 在激活细胞基底侧 Cl^- 通道的同时还能激活NKA, 从外界吸收 Na^+ , 从而实现水生动物的渗透调节平衡。我们在2个区域的肾组织中发现部分DEGs富集到了cAMP信号通路, 且差异显著, 提示青海湖裸鲤肾脏也可依赖cAMP来调节体内渗透平衡。此外, Péqueux等^[25]的研究证明钙调蛋白参与离子转运, 可激活 Cl^- 通道并对 Na^+ 的吸收产生影响。我们也在2个区域的鳃、肾组织中均筛选到了作为钙调蛋白下游靶基因的钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶的显著表达。

3.3 免疫相关基因的筛选及分析

盐碱度是影响水生生物生命活动最主要的外界因素之一, 在改变鱼体内环境渗透压稳态的同

时还伴随着鱼体免疫功能的变化^[13]。肾脏不仅具有泌尿和渗透调节的作用, 作为硬骨鱼主要的免疫器官, 在盐碱耐受过程中发挥着重要的免疫防御作用。随着水环境中盐碱度的增加, 鱼体抗病变能力下降, 导致易受到水体中病原微生物的侵入, 在此过程中肾脏上的免疫相关因子的含量就会发生相应的变化以应对外界环境的刺激。

由于青海湖具有盐碱度含量高、高海拔、紫外线辐射强、贫营养等极端的水文环境特点, 使得生活在其中的青海湖裸鲤在生长较其他鱼类相比较为缓慢^[26], 并较其他鱼表现出极强的盐碱适应性和耐受性, 且高盐碱环境胁迫下会导致青海湖裸鲤的免疫能力下降。本研究结果显示, 免疫相关基因如白细胞介素、补体、免疫球蛋白、干扰素诱导蛋白、颗粒酶 B 等的显著差异表达, 说明青海湖裸鲤通过表达这些基因以减缓盐碱环境胁迫所导致的应激反应, 且大部分免疫相关基因都显著下调。这与郭雯翥等^[27]的研究结果相符, 其通过构建青海湖裸鲤在高盐碱环境下的抑制消减 cDNA 文库, 在转录水平上研究了基因表达差异, 且发现免疫相关的基因表达下调。Tong 等^[28]在提取青海湖裸鲤肾脏和鳃组织样本进行转录组测序后, 发现了大量免疫相关候选基因(如 Toll-like 样受体、干扰素调节因子白细胞介素以及肿瘤坏死因子)。同样, 我们也在免疫相关基因中筛选获得了白细胞介素的显著差异表达, 其他免疫相关基因未在本研究中筛选获得。但在本研究中, 我们筛选到整合素家族相关基因在鳃、肾脏组织中均显著差异表达, 表明除白细胞介素外, 该基因也是青海湖裸鲤免疫防御系统中的重要组成因子。此外, 本研究中还发现, 青海湖水域中大部分免疫相关基因的下调可能是由于青海湖水域的青海湖裸鲤所面对的微生物种类较淡水少, 故使得其免疫应激能力较淡水下调。

补体作为一种存在于脊椎动物血清和组织液中的血清蛋白质, 可在机体被病原体感染时激活, 通过吞噬或裂解病原微生物来介导免疫应答和炎症反应。已有对哺乳动物的研究表明, 补体和凝血系统涉及了炎症的发病机制^[29]。本研究中, 鳃组织和肾脏中显著富集到补体和凝血级联 (complement and coagulation cascades) 信号通路的 DEGs 也主要为补体 (complement) 和补体成分 (complement component)。肾脏组织中补体基因的表达显著上调表明了免疫防御和清除病原体功

能方面, 补体发挥了十分重要的作用, 这与 Encinas 等^[30]在对斑马鱼不同组织器官进行 VHSV 病毒感染后发现补体基因表达上调的结果一致。C3 作为补体系统激活通路的中间枢纽, 可通过激活末端补体通路来发挥清除病原体功能, 其主要在肝脏中表达。且有研究表明鱼类 C3 表达具有组织差异性, 如虹鳟肝脏中 C3 表达量最高, 肝外组织表达量则较低^[31]。在对牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 进行鳃弧菌感染前后的脾脏转录组研究中未检测到 C3 在脾脏中表达^[32]。在对日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 进行氨氮胁迫后的转录组分析中也发现肝胰腺、鳃和心脏组织中 C3 基因的表达量相对肌肉和血液组织表达量高^[33], 本研究也仅在鳃组织中筛选获得 C3 基因显著表达。此外, 鳃组织中补体基因的下调也表明不同组织在补体防御和清除病原体方面可能具有不同的响应机制。并且本研究 2 个区域的青海湖裸鲤鳃组织中筛选获得的免疫相关基因的数量多于肾脏, 推测在裸鲤盐碱耐受过程的免疫防御能力方面, 鳃组织的免疫调节能力可能更强。

3.4 代谢相关基因的筛选及分析

外界水环境的变化通常会导致鱼类能量的大量消耗, 不同渗透压环境下的鱼类为适应渗透压会通过改变自身的生理变化来调整机体的渗透压平衡, 使其能够产生足够的耗氧量以维持自身正常生命活动^[34-35]。本研究中, 青海湖裸鲤在从淡水组到河口组时生态位发生了一定的改变, 导致其可能选择不同的代谢策略以适应环境中盐碱度的增加。

Su 等^[36]在对 3 种胁迫下杂交罗非鱼的鳃转录组研究中发现, 盐碱胁迫下富集到的通路主要为生物合成和代谢相关, 同样本研究中筛选得到的代谢相关信号通路也主要与生物合成和代谢相关, 主要集中在氨基酸代谢相关通路。Jiang 等^[37]研究也证实了氨基酸代谢在渗透调节中起着关键作用。精氨酸是一种在有机体内具有重要生理、代谢调控功能的半必需氨基酸, 同时其作为内源性一氧化氮合成的唯一前体, 可在一氧化氮合成酶的作用下生成一氧化氮, 生成的一氧化氮进而可以调节机体内产能底物的代谢过程^[38]。精氨酸激酶可催化生成 ADP 和磷酸精氨酸, 为细胞提供能量需求, 同时生成的精氨酸则作为一氧化氮合成酶催化生成一氧化氮的唯一反应底物, 结合生成一氧

化氮从而其能够发挥生理功能。本研究中, 青海湖水域组和淡水组鳃组织在精氨酸和脯氨酸代谢途径中表达上调的重要基因为一氧化氮合成酶基因, 而在 2 个区域的肾脏组织中该基因则显著下调表达, 说明在不同组织中一氧化氮合成酶可能是通过不同的调节方式参与机体的能量代谢过程。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 可参与生物活性分子如类固醇、维生素和脂肪酸的代谢。维生素 D 的生理功能主要通过活性形式的 1, 25-(OH)D₃ 来实现的^[39]。细胞色素 P450 将与维生素 D₃ 结合蛋白结合后的维生素 D₃ 羟化为 2,5-(OH)D₃, 转运到肾脏后生成具有活性的 1, 25-(OH)D₃。而肾脏分泌的 1,25-二羟基维生素 D(3) 24-羟化酶可以在 2,5-(OH)D₃ 或 1, 25-(OH)D₃ 浓度过高时通过与之相互作用来抑制其表达, 在实现体内维生素 D 含量的动态平衡的同时发挥调节机体钙磷代谢以及部分免疫调节功能^[40]。我们在不同区域的鳃、肾脏组织中均筛选得到了 1,25-二羟基维生素 D(3) 24-羟化酶和细胞色素 P450 基因的显著表达, 表明盐碱耐受过程中青海湖裸鲤可通过细胞色素 P450 和 1,25-二羟基维生素 D(3) 24-羟化酶的上调来稳定体内的钙磷代谢过程。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 梁利群, 任波, 常玉梅, 等. 中国内陆咸(盐碱)水资源及渔业综合开发利用[J]. *中国渔业经济*, 2013, 31(4): 138-145.
Liang L Q, Ren B, Chang Y M, *et al.* Inland brackish (alkaline-saline) water resources and fisheries utilization in China[J]. *Chinese Fisheries Economics*, 2013, 31(4): 138-145 (in Chinese).
- [2] 黎道丰, 蔡庆华. 不同盐碱度水体的鱼类区系结构及主要经济鱼类生长的比较[J]. *水生生物学报*, 2000, 24(5): 493-501.
Li D F, Cai Q H. Comparison of fish fauna structure and main economic fish growth among different saline and alkaline waters[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(5): 493-501 (in Chinese).
- [3] 梁健, 陈雪妍, 卫唯, 等. 青海湖裸鲤 *TOB1* 和 *TOB2* 基因的克隆与表达分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(5): 31-41.
Liang J, Chen X Y, Wei W, *et al.* Cloning and expres-
- sion analysis of *TOB1* and *TOB2* genes in naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) in Qinghai Lake[J]. *Journal of Northwest A& F University (Natural Science Edition)*, 2020, 48(5): 31-41 (in Chinese).
- [4] 马清花, 陈雪妍, 卫唯, 等. 青海湖裸鲤 *AP-1* 基因的克隆与表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(7): 2964-2971.
Ma Q H, Chen X Y, Wei W, *et al.* Cloning and expression analysis of *AP-1* gene in *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(7): 2964-2971 (in Chinese).
- [5] 么宗利, 王慧, 周凯, 等. 碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(5): 945-950.
Yao Z L, Wang H, Zhou K, *et al.* Effects of water carbonate alkalinity and pH on survival rate of post-larval *Litopenaeus vannamei*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(5): 945-950 (in Chinese).
- [6] Wang W N, Zhou J, Wang P, *et al.* Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 150(4): 428-435.
- [7] Li C C, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(6): 701-709.
- [8] 刘济源, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫对青海湖裸鲤耗氧率、血浆渗透浓度和离子浓度的影响[J]. *生态学杂志*, 2012, 31(3): 664-669.
Liu J Y, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Effects of saline-alkali stress on the oxygen consumption and plasma osmolality and ion concentrations of *Gymnocypris przewalskii*[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(3): 664-669 (in Chinese).
- [9] 党云飞, 徐伟, 耿龙武, 等. 盐碱和 pH 对鱼类生长和发育的影响[J]. *水产学杂志*, 2012, 25(2): 62-64.
Dang Y F, Xu W, Geng L W, *et al.* A review of effects of saline-alkalinity and pH on growth and development in fish[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2012, 25(2): 62-64 (in Chinese).
- [10] 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.
- [11] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [12] Hirose S, Kaneko T, Naito N, *et al.* Molecular biology of major components of chloride cells[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2003, 136(4): 593-620.
- [13] Geven E J W, Klaren P H M. The teleost head kidney: integrating thyroid and immune signalling[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2017, 66(1): 73-83.
- [14] Seo M Y, Mekuchi M, Teranishi K, *et al.* Expression of ion transporters in gill mitochondrion-rich cells in Japanese eel acclimated to a wide range of environmental salinity[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, 166(2): 323-332.
- [15] Burton D, Burton M. Essential fish biology: diversity, structure and function[M]. Oxford: Oxford University Press, 2017.
- [16] Takei Y, Hwang P P. Homeostatic responses to osmotic stress[J]. *Fish Physiology*, 2016, 35: 207-249.
- [17] Suzuki Y, Itakura M, Kashiwagi M, *et al.* Identification by differential display of a hypertonicity-inducible inward rectifier potassium channel highly expressed in chloride cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274(16): 11376-11382.
- [18] Evans D H, Piermarini P M, Choe K P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(1): 97-177.
- [19] Marshall W S. Mechanosensitive signalling in fish gill and other ion transporting epithelia[J]. *Acta Physiologica*, 2011, 202(3): 487-499.
- [20] Hiroi J, McCormick S D. New insights into gill ionocyte and ion transporter function in euryhaline and diadromous fish[J]. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 2012, 184(3): 257-268.
- [21] Hwang P P, Sun C M, Wu S M. Changes of plasma osmolality, chloride concentration and gill Na-K-ATPase activity in tilapia *Oreochromis mossambicus* during seawater acclimation[J]. *Marine Biology*, 1989, 100(3): 295-299.
- [22] Kang C K, Tsai S C, Lee T H, *et al.* Differential expression of branchial Na^+/K^+ -ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2008, 151(4): 566-575.
- [23] 庄青青. 盐度胁迫下尼罗罗非鱼鳃离子细胞和 Na^+/K^+ -ATPase a1 的渗透调节 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
- Zhuang Q Q. Osmoregulation of ionocytes and Na^+/K^+ -ATPase a1 in gill of *O. niloticus* under salinities stress[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013 (in Chinese).
- [24] Mo J L, Devos P, Trausch G. Active absorption of Cl^- and Na^+ in posterior gills of Chinese crab *Eriocheir sinensis*: modulation by dopamine and cAMP[J]. *Journal of Crustacean Biology*, 2003, 23(3): 505-512.
- [25] Péqueux A, Gilles R. Calmodulin as a modulator of NaCl transport in the posterior salt-transporting gills of the Chinese crab *Eriocheir sinensis*[J]. *Marine Biology*, 1992, 113(1): 65-69.
- [26] Walker K F, Dunn I G, Edwards D, *et al.* A fishery in a changing lake environment: the naked carp *Gymnocypris przewalskii* (Kessler) (Cyprinidae: Schizothoracinae) in Qinghai Hu, China[J]. *International Journal of Salt Lake Research*, 1995, 4(3): 169-222.
- [27] 郭雯翊, 么宗利, 来琦芳, 等. 盐碱胁迫下青海湖裸鲤鳃基因表达差异[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(2): 137-144.
- Guo W F, Yao Z L, Lai Q F, *et al.* Differential gene expression of *Gymnocypris przewalskii* under saline-alkali stress[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(2): 137-144 (in Chinese).
- [28] Tong C, Zhang C F, Zhang R Y, *et al.* Transcriptome profiling analysis of naked carp (*Gymnocypris przewalskii*) provides insights into the immune-related genes in highland fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 366-377.
- [29] Amara U, Rittirsch D, Flierl M, *et al.* Interaction between the coagulation and complement system[M]//Lambris J D. Current Topics in Complement II. New York: Springer, 2008.
- [30] Encinas P, Rodriguez-Milla M A, Novoa B, *et al.* 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- Zebrafish fin immune responses during high mortality infections with viral haemorrhagic septicemia rhabdovirus. A proteomic and transcriptomic approach[J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 518-534.
- [31] Løvoll M, Dalmo R A, Bøgvold J. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23(4): 721-731.
- [32] 黄琳. 牙鲈免疫相关基因及热休克蛋白基因的转录表达 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2015.
- Huang L. Transcriptional expression of immune-related genes and heat shock protein genes of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese).
- [33] 于杰伦. 日本沼虾免疫应答相关基因的筛选与鉴定 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- Yu J L. Identification and characterization of immune response related genes of *Macrobrachium nipponense*[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [34] Maxime V, Peyraud-Waitzenergger M, Claireaux G, *et al.* Effects of rapid transfer from sea water to fresh water on respiratory variables, blood acid-base status and O₂ affinity of haemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 1990, 160(1): 31-39.
- [35] 张龙岗. 盐度对淡水鱼类繁殖·生长及代谢相关指标的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(2): 1053-1055.
- Zhang L G. Effects of salinity on reproduction, growth and metabolism related indicators in freshwater fishes[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(2): 1053-1055 (in Chinese).
- [36] Su H H, Ma D M, Zhu H P, *et al.* Transcriptomic response to three osmotic stresses in gills of hybrid tilapia (*Oreochromis mossambicus* female × *O. urolepis hornorum* male)[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 110-130.
- [37] Jiang W W, Tian X L, Fang Z H, *et al.* Metabolic responses in the gills of tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) exposed to salinity stress using NMR-based metabolomics[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 465-474.
- [38] 王洪荣, 季昀. 氨基酸的生物活性及其营养调控功能的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2013, 25(3): 447-457.
- Wang H R, Ji Y. Advanced research in biological activities and functions of nutritional regulation of amino acids[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2013, 25(3): 447-457 (in Chinese).
- [39] 杨春华. 维生素D简介[J]. *中国实用医药*, 2009, 4(3): 243-244.
- Yang C H. Introduction of vitamin D[J]. *China Practical Medicine*, 2009, 4(3): 243-244 (in Chinese).
- [40] Christakos S, Dhawan P, Benn B, *et al.* Vitamin D: molecular mechanism of action[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2007, 1116(1): 340-348.

Screening and analysis of the osmotic, immune, metabolic related genes of *Gymnocypris przewalskii* in saline-alkali tolerance

ZHANG Haichen, MA Qinghua, XU Baoke, A Linlin, LIANG Jian*

(State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, College of Eco-Environmental Engineering, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract: *Gymnocypris przewalskii* is an important indigenous economic fish in Qinghai Lake, which plays a key role in the whole Qinghai Lake ecosystem and shows a strong saline-alkali tolerance and adaptability compared with other fishes. In order to explore the important functional genes of *G. przewalskii* during the process of saline-alkali tolerance, Illumina HiSeq technology was used to define the transcriptome of gill and kidney tissues of *G. przewalskii* in two areas (Qinghai Lake and the Quanji River). All kinds of clean data reached more than 6.74 Gb, and the percentage of q30 base was more than 94.38%. After quality control and assembly, a total of 541 429 unigenes were obtained, the average length of N50 was 612 bp. The sequences acquired were blasted against NR, Swiss-Prot, pfam, COG, GO and KEGG databases, finally, 107 568 unigenes could be annotated. Differential expression analysis showed that a total of 832 genes were co-expressed in the gills and kidneys in two regions. Gene ontology analysis indicated that differentially expressed genes (DEGs) annotated to binding, cellular process, metabolic process, and single-organism process accounted for a large proportion. Based on KEGG pathway analysis, the pathways related to immunity, metabolism and penetration were enriched. According to the GO annotation of DEGs and the enrichment analysis of KEGG signaling pathway, we initially screened 35, 34, and 25 genes related to osmotic, immunity, and metabolism of *G. przewalskii*, respectively. The osmotic related genes included calcium/calmodulin-dependent protein kinase, sodium/potassium transporting ATPase, and mitogen-activated protein kinase, solute carrier family, etc, immune related genes mainly included interleukin, complement, integrin, granzyme B, etc; nitric oxide synthase, 1,25-dihydroxyvitamin D (3) 24-hydroxylase, cytochrome P450 and elongation factor were related to metabolism of *G. przewalskii*. Sixteen differentially DEGs were randomly selected for quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the results were consistent with the RNA-seq. The result of this study enriches the basic data of *G. przewalskii*'s omics research, and also provides a reference for further study of *G. przewalskii* in saline-alkali tolerance.

Key words: *Gymnocypris przewalskii*; transcriptome sequencing; saline-alkali tolerance; differentially expressed genes

Corresponding author: LIANG Jian. E-mail: liangjianws@126.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31960741); Science and Technology Project of Qinghai Province (2016-ZJ-940Q)

附表 1 鳃组织渗透、免疫、代谢相关基因

Tab. S1 Osmotic, immune, metabolism related genes in gill

组别 groups	基因ID gene_ID	基因名称 gene name	Log ₂ FC (B/C)	上调/下调 up/down	P值 P-value	是否关键基因 key gene
渗透 osmotic	TRINITY_DN234107_c2_g2	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1D-like isoform X2	5.886	上调	5.183×10 ⁻¹³	
	TRINITY_DN263264_c2_g1	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II delta 2 chain isoform X8	5.025	上调	1.767×10 ⁻³	
	TRINITY_DN268160_c0_g1	瞬时受体电位阳离子通道 transient receptor potential cation channel subfamily M member 2 isoform X1	4.311	上调	2.541×10 ⁻⁷	是
	TRINITY_DN273530_c1_g2	囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-like	3.778	上调	1.420×10 ⁻¹¹	
	TRINITY_DN251604_c3_g1	肝凝集素 hepatic lectin-like	3.696	上调	1.169×10 ⁻¹³	
	TRINITY_DN268295_c0_g1	单羧酸转运蛋白 monocarboxylate transporter 4-like	2.970	上调	4.911×10 ⁻¹⁴	是
	TRINITY_DN274045_c3_g2	鸟苷酸结合蛋白 guanylate-binding protein 1-like	-3.089	下调	8.872×10 ⁻⁷	
	TRINITY_DN249765_c0_g1	上皮氯通道蛋白 epithelial chloride channel protein-like	-4.205	下调	2.282×10 ⁻²⁴	是
	TRINITY_DN266493_c0_g1	一氧化氮合酶 nitric oxide synthase,inducible-like	-5.403	下调	2.204×10 ⁻²³	
免疫 immune	TRINITY_DN250304_c4_g1	补体成分 complement component C7-1	3.867	上调	1.589×10 ⁻¹¹	是
	TRINITY_DN268733_c2_g1	整合素 integrin alpha-6-like	3.058	上调	6.862×10 ⁻¹⁷	
	TRINITY_DN271867_c3_g2	整合素 integrin alpha-2	2.509	上调	7.251×10 ⁻¹²	
	TRINITY_DN240143_c1_g1	整合素 integrin alpha-2-like	2.481	上调	2.614×10 ⁻⁷	
	TRINITY_DN243848_c0_g1	C-X-C 基序趋化因子 C-X-C motif chemokine 11-like	-2.501	下调	7.025×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN228329_c3_g1	C-X-C 基序趋化因子 C-X-C motif chemokine 11-like	-2.528	下调	6.768×10 ⁻⁵	
	TRINITY_DN246514_c0_g2	免疫球蛋白 immunoglobulin mu heavy chain,partial	-2.566	下调	4.363×10 ⁻¹²	
	TRINITY_DN231007_c0_g1	白细胞介素 interleukin-17C-like	-2.905	下调	1.157×10 ⁻³	
	TRINITY_DN263956_c0_g1	补体因子 complement factor I-like	-3.082	下调	5.502×10 ⁻⁷	是
	TRINITY_DN272187_c3_g2	补体C3 complement C3-like	-3.261	下调	4.728×10 ⁻⁸	是
	TRINITY_DN210117_c0_g1	免疫球蛋白 immunoglobulin mu heavy chain	-3.370	下调	4.202×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN233988_c0_g1	补体C3 complement C3-like	-3.581	下调	2.815×10 ⁻¹²	
	TRINITY_DN240066_c0_g1	补体因子 complement factor H-like	-3.588	下调	2.627×10 ⁻⁶	
	TRINITY_DN273767_c5_g1	补体C3 complement C3-like	-3.597	下调	8.405×10 ⁻¹⁵	
	TRINITY_DN233988_c0_g2	补体C3 complement C3-like	-3.994	下调	9.991×10 ⁻¹⁴	
	TRINITY_DN262524_c3_g1	补体C3 complement C2-like	-4.880	下调	5.032×10 ⁻⁴	是
	TRINITY_DN211177_c0_g2	干扰素诱导蛋白 interferon-induced very large GTPase 1-like	-5.055	下调	1.509×10 ⁻³	
	TRINITY_DN233295_c0_g1	白细胞介素 interleukin 4/13B precursor	-5.356	下调	3.379×10 ⁻⁸	
	TRINITY_DN226005_c0_g1	白细胞介素 interleukin-17F-like	-5.548	下调	2.323×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN219207_c0_g2	免疫球蛋白 immunoglobulin Z heavy chain,partial	-8.029	下调	1.406×10 ⁻⁹	

· 续附表 1 ·

组别 groups	基因ID gene_ID	基因名称 gene name	Log ₂ FC (B/C)	上调/下调 up/down	P值 P-value	是否关键基因 key gene
代谢 metabolism	TRINITY_DN270314_c1_g3	L-天冬氨酸脱氢酶 putative L-aspartate dehydrogenase	6.743	上调	5.495×10 ⁻⁶	
	TRINITY_DN212228_c0_g1	肉碱O-棕榈酰转移酶1 carnitine O-palmitoyltransferase 1,liver isoform	6.100	上调	4.268×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN210099_c0_g1	乙醇脱氢酶 aldehyde dehydrogenase,mitochondrial-like	4.678	上调	1.278×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN257465_c1_g2	1,25-二羟基维生素D(3)24-羟化酶 1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase	4.291	上调	9.662×10 ⁻⁵	是
	TRINITY_DN236440_c0_g1	延伸因子 elongation factor 1-alpha-like	4.165	上调	1.093×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN274365_c5_g4	细胞色素P450 cytochrome P450 3A30-like	2.948	上调	9.145×10 ⁻⁹	是
	TRINITY_DN264476_c1_g2	γ-谷氨酰转肽酶 gamma-glutamyltranspeptidase 1-like	2.915	上调	3.128×10 ⁻³	
	TRINITY_DN198767_c0_g1	细胞色素P450 cytochrome P450 1A,partial	2.867	上调	3.734×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN265467_c0_g2	jun二聚化蛋白 jun dimerization protein 2	-3.459	下调	8.458×10 ⁻¹⁷	
	TRINITY_DN255224_c1_g2	基质金属蛋白酶 matrix metalloproteinase-24 isoform X1	-4.577	下调	6.105×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN266493_c0_g1	一氧化氮合酶 nitric oxide synthase,inducible-like	-5.403	下调	2.204×10 ⁻²³	
	TRINITY_DN269507_c5_g1	花生四烯酸5-脂肪氧化酶 arachidonate 5-lipoxygenase-like	-6.297	下调	3.657×10 ⁻⁷	

附表 2 肾组织渗透、免疫、代谢相关基因

Tab. S2 Osmotic, immune, metabolism related genes in kidney

组别 groups	基因ID gene_ID	基因名称 gene name	Log ₂ FC (E/F)	上调/下调 up/down	P值 P-value	是否关键基因 key gene
渗透 osmotic	TRINITY_DN256141_c2_g3	真核翻译起始因子 eukaryotic translation initiation factor 4E-1B isoform X1	5.120	上调	3.362×10 ⁻³	
	TRINITY_DN263316_c0_g3	溶质载体家族 41 solute carrier family 41 member 1-like	5.109	上调	6.639×10 ⁻⁸	是
	TRINITY_DN262851_c1_g1	溶质载体家族 41 solute carrier family 41 member 1-like	4.884	上调	2.494×10 ⁻¹¹	是
	TRINITY_DN251604_c3_g1	肝凝集素 hepatic lectin-like	3.451	上调	3.336×10 ⁻¹²	
	TRINITY_DN264233_c0_g1	瞬时受体电位通道 6 short transient receptor potential channel 6	3.131	上调	1.385×10 ⁻¹³	
	TRINITY_DN255214_c0_g1	钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶 calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1G-like	3.122	上调	1.608×10 ⁻³	
	TRINITY_DN262021_c0_g1	烟酰胺磷酸核糖转移酶 nicotinamide phosphoribosyltransferase-like	2.864	上调	1.503×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN268295_c0_g1	单羧酸转运蛋白 monocarboxylate transporter 4-like	2.819	上调	1.047×10 ⁻⁷	是
	TRINITY_DN257280_c0_g1	溶质载体家族 45 solute carrier family 45 member 3-like	2.752	上调	2.169×10 ⁻¹⁰	
	TRINITY_DN259098_c3_g1	溶质载体家族 26 solute carrier family 26 member 6-like	2.710	上调	5.471×10 ⁻¹⁰	
	TRINITY_DN251941_c0_g2	瞬时受体电位通道 6 short transient receptor potential channel 6-like	2.645	上调	1.505×10 ⁻⁶	
	TRINITY_DN254138_c6_g2	丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase 14A-like isoform X1	2.621	上调	5.672×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN273217_c0_g2	氯离子通道蛋白 chloride channel protein 2-like	2.600	上调	7.029×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN261411_c1_g1	磷酸甘油酸变位酶 phosphoglycerate mutase 1,partial	2.544	上调	2.051×10 ⁻¹¹	是
	TRINITY_DN266504_c1_g1	丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase 15 isoform X1 [Sinocyclocheilus grahami]	2.506	上调	1.132×10 ⁻¹⁰	

· 续附表 2 ·

组别 groups	基因ID gene_ID	基因名称 gene name	Log ₂ FC (E/F)	上调/下调 up/down	P值 P-value	是否关键基因 key gene
	TRINITY_DN188632_c0_g1	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1-like isoform X1	-2.563	下调	2.535×10 ⁻⁴	是
	TRINITY_DN274045_c3_g2	鸟苷酸结合蛋白 guanylate-binding protein 1-like	-2.631	下调	4.187×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN247831_c1_g1	羧肽酶 carboxypeptidase A1-like	-2.830	下调	4.402×10 ⁻¹¹	
	TRINITY_DN220158_c0_g1	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1-like	-3.301	下调	2.342×10 ⁻³	是
	TRINITY_DN256680_c5_g3	胞质磷脂酶 cytosolic phospholipase A2-like	-3.353	下调	2.798×10 ⁻⁶	
	TRINITY_DN270299_c4_g2	β-1 肾上腺素能受体 beta-1 adrenergic receptor-like	-3.358	下调	3.321×10 ⁻¹¹	
	TRINITY_DN241957_c0_g3	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 isoform X3	-3.379	下调	8.980×10 ⁻⁴	是
	TRINITY_DN270913_c1_g1	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1-like isoform X2	-3.447	下调	3.348×10 ⁻³	
	TRINITY_DN155170_c0_g1	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1-like	-3.467	下调	4.114×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN211188_c0_g3	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1-like isoform X1	-4.898	下调	1.401×10 ⁻⁴	是
	TRINITY_DN250779_c0_g2	钠/钾转运ATP酶 sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	-5.173	下调	2.834×10 ⁻³	是
免疫 immune	TRINITY_DN240143_c1_g1	整合素 integrin alpha-2-like	4.602	上调	1.467×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN271867_c3_g2	整合素 integrin alpha-2	4.163	上调	1.613×10 ⁻¹²	
	TRINITY_DN233485_c1_g1	前列腺干细胞抗原 prostate stem cell antigen-like	3.988	上调	4.780×10 ⁻⁸	
	TRINITY_DN229897_c0_g1	白细胞介素 interleukin-8-like	3.699	上调	9.152×10 ⁻⁹	是
	TRINITY_DN250304_c4_g1	补体成分 complement component C7-1,partial	3.674	上调	3.542×10 ⁻¹⁰	是
	TRINITY_DN271900_c2_g1	整合素 integrin alpha-5-like,partial	3.308	上调	6.971×10 ⁻¹⁵	
	TRINITY_DN234155_c0_g1	白细胞介素 interleukin-1 receptor type 2-like isoform X1	3.232	上调	5.873×10 ⁻⁵	
	TRINITY_DN240401_c0_g1	整合素 integrin alpha-6-like	2.872	上调	3.054×10 ⁻⁵	
	TRINITY_DN273767_c5_g3	白细胞介素 complement C3-like isoform X1	-2.659	下调	6.453×10 ⁻⁵	
	TRINITY_DN266555_c1_g1	颗粒酶B granzyme B-like,partial	-2.773	下调	8.097×10 ⁻⁶	是
	TRINITY_DN272550_c2_g1	整合素 integrin beta-3-like isoform X1	-2.902	下调	3.681×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN228329_c3_g1	C-X-C 基序趋化因子 C-X-C motif chemokine 11-like	-2.922	下调	4.406×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN243848_c0_g1	C-X-C 基序趋化因子 C-X-C motif chemokine 11-like	-3.450	下调	4.084×10 ⁻⁸	
	TRINITY_DN211177_c0_g2	干扰素诱导蛋白VLIg蛋白亚家族 interferon-induced very large GTPase 1-like	-5.812	下调	6.671×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN236440_c0_g1	延伸因子 elongation factor 1-alpha-like	6.205	上调	2.551×10 ⁻³	
	TRINITY_DN266493_c0_g1	一氧化氮合酶 nitric oxide synthase, inducible-like	4.457	上调	1.546×10 ⁻⁶	

· 续附表 2 ·

组别 groups	基因ID gene_ID	基因名称 gene name	Log ₂ FC (E/F)	上调/下调 up/down	P值 P-value	是否关键基因 key gene
	TRINITY_DN257465_c1_g2	1,25-二羟基维生素D(3) 24-羟化酶 1,25-dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase,mitochondrial	4.103	上调	8.543×10 ⁻⁶	是
	TRINITY_DN267218_c3_g1	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶3 6-phosphofructo-2-kinase/fructose- 2,6-bisphosphatase 3 isoform X1	3.696	上调	2.049×10 ⁻⁹	
	TRINITY_DN263649_c0_g1	尿嘧啶-DNA糖基化酶 uracil-DNA glycosylase-like	3.491	上调	2.822×10 ⁻⁶	
	TRINITY_DN267020_c0_g2	磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 phosphoenolpyruvate carboxykinase, cytosolic [GTP]-like	3.008	上调	1.152×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN249342_c0_g1	L-苏氨酸3-脱氢酶 L-threonine 3-dehydrogenase,mitochondrial-like	2.902	上调	6.466×10 ⁻¹⁴	
	TRINITY_DN254138_c6_g2	丝裂原活化蛋白激酶 mitogen-activated protein kinase 14A-like isoform X1 [Sinocyclocheilus grahami])	2.621	上调	5.673×10 ⁻⁴	
	TRINITY_DN261411_c1_g1	磷酸甘油酸变位酶 phosphoglycerate mutase 1,partial	2.544	上调	2.051×10 ⁻¹¹	
	TRINITY_DN274365_c5_g4	细胞色素P450 cytochrome P450 3A30-like	2.528	上调	9.556×10 ⁻⁶	是
	TRINITY_DN250796_c1_g1	细胞色素b-245 重链 cytochrome b-245 heavy chain-like	-2.509	下调	2.444×10 ⁻⁸	
	TRINITY_DN237775_c2_g2	1-磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸磷酸二酯酶 γ 1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2-like	-3.417	下调	2.390×10 ⁻⁵	
	TRINITY_DN255224_c1_g2	基质金属蛋白酶 matrix metalloproteinase-24 isoform X1	-5.793	下调	5.329×10 ⁻⁴	