



织锦巴非蛤不同颜色斧足的转录组

曾庆民¹, 赵虹博², 邓素贞², 章孝颖², 刘贤德^{2*}

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013;

2. 集美大学水产学院, 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

摘要: 为探索织锦巴非蛤斧足颜色差异的分子机制, 以指导高品质织锦巴非蛤的选育工作, 实验对织锦巴非蛤橘黄色和浅白色的斧足进行二代和三代转录组测序及差异表达分析。二代测序结果显示, 6 个样品共产生 44.82 Gb clean data, GC 含量为 35.30%~38.21%, Q30 碱基百分比均在 94.43% 以上。三代测序结果显示, 橘黄色斧足组和浅白色斧足组分别得到 16 968 和 21 611 条高质量转录本, 将其与各数据库进行比对, 共获得 5 058 条有注释信息的全长转录本。以三代全长转录本作为参考序列, 将二代数据比对回参考序列, 鉴定到 57 个差异表达转录本。其中, 橘黄色斧足组相对于浅白色斧足组有 34 个差异转录本表达量上调, 23 个差异转录本表达量下调。使用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 对随机挑选的 12 个差异表达转录本进行验证, 其结果与转录组分析结果一致。随后, 通过生物信息学分析发现, 脂肪酸的生物合成和代谢、肌肉成分、能量代谢等都影响织锦巴非蛤斧足颜色的调控, 其中过氧化物酶体增值物激活受体 (PPARs) 调节着脂肪酸的生物合成和代谢, 肌钙蛋白是肌肉的重要组成成分, 精氨酸激酶 (AK) 参与了色素富集过程中的能量供应。研究表明, PPARs、肌钙蛋白和 AK 在织锦巴非蛤色素富集过程中发挥着重要作用。

关键词: 织锦巴非蛤; 类胡萝卜素; 斧足; 转录组测序; 差异表达转录本

中图分类号: Q 785; S 968.35

文献标志码: A

织锦巴非蛤 (*Paphia textile*) 属于软体动物门 (Mollusca) 双壳纲 (Bivalvia) 帘蛤目 (Veneroida) 帘蛤科 (Veneridae) 巴非蛤属 (*Paphia*)^[1]。该种与波纹巴非蛤 (*P. undulata*) 外表相似, 前者个体较大、壳重且表面光滑, 贝壳内面洁白, 常栖息于沙质底部、潮下带; 后者壳较薄呈长卵圆形, 表面平滑有淡褐色外壳, 贝壳内面中央紫红色, 生活于浅海软泥底部^[2]。织锦巴非蛤的运动能力较弱, 靠发达的斧足可以做短距离的运动, 不具有远距离迁徙的能力。其内部结构比较简单, 由斧足、鳃、外套膜、闭壳肌、性腺以及内脏团组成, 水流从进水管进入其体内, 靠过滤水中的藻类为食,

主要摄食 1 μm 以下的浮游植物。织锦巴非蛤养殖成本低、肉质细嫩独特、营养丰富, 是我国浅海养殖的重要经济贝类之一^[3]。

近年来, 随着生活水平的提高, 消费者在购买食品时越来越注重食品的质量, 而颜色是判断食品质量的重要指标之一。有吸引力的颜色不仅可以提升商品的价值, 而且可以提高食欲^[4]。目前, 一些研究结果表明贝类肉质颜色主要与类胡萝卜素的富集和转运有关。如 Liu 等^[5]在研究华贵栉孔扇贝 (*Chlamys nobilis*) 时发现, 橙色肌肉个体中的类胡萝卜素含量明显高于棕色个体, 这可能与一种 B 类清道夫受体 (SRB-like-3) 有关。任

收稿日期: 2021-12-24 修回日期: 2022-01-18

资助项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项 (2018YFD0901404)

第一作者: 曾庆民 (照片), 从事水产动物苗种繁育和养殖技术研究, E-mail: 2505467040@qq.com

通信作者: 刘贤德, 从事水产动物遗传育种研究, E-mail: xdliu@jmu.edu.cn



晓亮等^[6]研究了虾夷扇贝 (*Patinopecten yessoensis*) 闭壳肌中类胡萝卜素的积累, 推测在虾夷扇贝橙色闭壳肌中类胡萝卜素的积累和运输过程中, 清道夫受体可能是调控类胡萝卜素吸收的关键基因。Zhang 等^[7]比较了海大金贝和普通虾夷扇贝, 发现了 7 个差异表达的蛋白质, 并推测过氧化物酶体增值物激活受体 (peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs) 可能在类胡萝卜素含量的差异表达中起关键作用。在之前工作中发现, 织锦巴非蛤斧足颜色深浅与总类胡萝卜素含量呈显著正相关^[8], 然而, 导致织锦巴非蛤斧足颜色差异的分子调控机制目前还不清楚。基于此, 本研究应用 Illumina NovaSeq 6 000 为代表的二代测序技术和以 PacBio 为代表的第三代测序技术对织锦巴非蛤不同颜色的斧足进行转录组测序, 以三代全长转录本作为参考基因组, 将二代数据比对回参考基因组上, 发掘与颜色差异相关的候选转录本, 并分析这些转录本在不同颜色斧足中的表达情况, 为后续开展基因功能研究和分子育种实践提供基础信息。

1 材料与方法

1.1 动物材料

实验用织锦巴非蛤取自广东省湛江市养殖海区, 采集时间为 2018 年 11 月。材料平均规格: 鲜体质量 (21.67±2.50) g、壳长 (55.10±1.69) mm、壳宽 (31.80±0.97) mm、壳高 (19.76±0.75) mm。从同一群体中约 500 只织锦巴非蛤中挑选斧足颜色差异较大的雌性个体 6 个, 分成 2 组, 每组 3 个生物学重复。斧足颜色深的 (橘黄色) 个体记为 D1、D2 和 D4, 斧足颜色浅的 (浅白色) 个体记为 L1、L2、L3, 进行二代测序分析。随后, 将斧足颜色深的 D1、D2、D4 3 个生物学重复混合为 M1, 斧足颜色浅的 L1、L2 和 L3 3 个生物学重复混合为 M2, 进行三代测序分析。

1.2 斧足颜色测量

剪取斧足后, 使用磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 冲洗并擦拭干净, 通过 CM-700d 分光光度计 (日本柯尼卡美能达) 直接测量样品 D1、D2、D4 和 L1、L2 和 L3 的 L^* 、 a^* 、 b^* 三色指数。采用 Excel 2016 软件对数据进行显著性分析, 结果以平均值±标准误 (mean±SE) 表示, $P<0.05$ 表示有显著差异, $P>0.05$ 表示无显著差异。

1.3 文库构建与测序

按照全式金生物技术有限公司 (北京) ER501 *TransZol Up plus RNA kit* 的说明提取斧足的总 RNA。建库过程: ①利用磁珠和 Oligo (dT) 富集真核生物 mRNA; ②使用 SMARTer™ PCR cDNA Synthesis Kit 将 mRNA 逆转录成 cDNA; ③PCR 富集全长 cDNA; ④使用 BluePippin 筛选全长 cDNA 片段, 构建不同长度的插入片段文库; ⑤筛选出的全长 cDNA 再次进行 PCR 富集; ⑥对全长 cDNA 进行末端修复, 连接 SMRT 哑铃型接头, 获得 SMRT bell 文库; ⑦ BluePippin 用于 3~6 kb 和 5~10 kb SMRT bell 文库的二次筛选, 获得测序文库。二代测序使用 Illumina 公司的 NovaSeq 6000 测序平台进行测序, 三代测序使用 PacBio Sequel 测序平台进行全长转录组测序^[9]。

1.4 生物信息学分析

对于测序下机的数据进行质控和过滤, 去除低质量和读长较短的 reads。过滤后的 reads 通过分类、聚类和矫正, 获得高质量的全长转录本; 由于全长转录本聚类较为严格, 采用 CD-HIT 软件对全长转录本去冗余, 随后进行功能注释。

以三代全长转录本作为参考序列, 采用 Bowtie 2 v2.1.0 软件将每个样品的 clean reads (二代数据) 比对回参考序列。利用 RESM 1.2.15 软件对 Bowtie 的比对结果进行统计, 得到每个样品比对到每条转录本上的 read count 数目, 然后对其进行 FPKM (fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced) 转换以分析转录本的表达水平。基于比对结果, 使用 edge R v3.16.5 软件分析转录本在各样本中的差异表达情况, 计算出差异表达的 P 值和 FDR (false discovery rate) 值, 并进行 GO 功能注释和 KEGG 富集分析。

1.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 验证

随机选取 6 个上调转录本和 6 个下调转录本, 采用 Primer premier 6.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, 选取 18S *rRNA* 作为内参基因, 利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法^[10] 确定样品中 mRNA 相对表达量, 结果用平均值±标准误 (mean±SE) 表示。

2 结果

2.1 斧足颜色测量结果

根据颜色指标 (L^* 、 a^* 、 b^*) 的测量结果, 织

锦巴非蛤 2 组斧足的颜色差异较为显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 织锦巴非蛤斧足颜色统计结果

Tab. 1 Color index of *P. textile* foot

分组 groups	颜色指标 color index		
	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *
橘黄色组 orange group	55.42±3.29 ^a	17.16±2.58 ^a	27.97±2.27 ^a
浅白色组 light white group	63.31±1.70 ^b	8.16±0.49 ^b	23.16±0.94 ^b

注: 不同小写字母表示 2 组之间 (纵向) 具有显著差异 ($P < 0.05$)
Notes: the means with different lower-case letters have significant differences at 0.05 probability level between two groups

2.2 二代测序数据结果

完成 6 个样品的二代转录组测序, 对 raw data 过滤后, 各样品的 clean reads 占原始数据的比例均达到 97.01% 以上, Q30 碱基百分比在 94.43% 及以上 (表 2)。

2.3 三代测序数据结果

利用 Pacbio 公司的 Sequel 三代测序平台, 完成了 2 个织锦巴非蛤混样的全长转录组测序, 分别进行了 1 个 SMRT cell 的测序反应, 筛选准确

性大于 0.75 的 ROI (reads of insert) 进行后续分析。ROIs 详细信息统计结果见表 3。

2.4 全长转录本分析

将从三代测序数据中筛选出的 ROI 进行分类后, 得到全长非嵌合转录本和非全长非嵌合转录本, 进一步对全长转录本进行聚类 and 矫正, 得到高质量转录本和低质量转录本详细统计结果 (表 4)。

2.5 全长转录本注释

将高质量的全长转录本序列与 GO、KEGG、KOG、NT、NR 和 SwissProt 数据库分别进行比对, 同一转录本可能注释到不同的数据库中, 最终总共获得 5 058 条有注释信息的转录本, 各数据库转录本注释的统计结果见表 5。

2.6 参考序列比对结果

采用 RSEM 软件, 以三代全长转录本作为参考序列, 将 6 个样品的 clean reads (二代数据) 比对回参考序列。比对情况统计结果见表 6。mapped reads 为比对到参考序列上的测序序列, mapped reads 将用于后续的分析。

表 2 二代测序数据 clean data 统计信息

Tab. 2 Statistics of second-generation sequencing data

样品 samples	有效数据占比/% effective rate	有效碱基总数/bp clean bases	Q30/% Q30	GC含量/% GC content
D1	98.39	8 147 182 800	95.19	37.76
D2	97.01	7 688 619 600	94.43	35.30
D4	98.59	6 929 714 700	95.10	36.97
L1	98.06	6 903 415 800	95.29	38.21
L2	97.87	7 609 570 200	94.45	37.11
L3	98.16	7 536 743 100	94.70	37.53

表 3 ROIs 统计结果

Tab. 3 Statistic results of ROIs

样品 samples	ROI数目/条 no. of reads of insert	ROI总碱基数/bp read bases of ROI	ROI平均长度/bp mean read length of ROI	ROI序列的平均质量值 mean read quality of ROI
M1	342 568	473 754 093	1 382	0.965
M2	401 054	829 528 130	2 068	0.967

表 4 全长转录本分析结果

Tab. 4 Full-length transcripts analysis results

样品 samples	全长非嵌合ROI数目/条 no. of full-length non-chimeric ROI	ICE聚类得到的一致 转录本序列数目/条 no. of consensus isoforms	经矫正后的高质量一致 转录本数目/条 no. of polished high-quality isoforms	经矫正后的低质量一致 转录本数目/条 no. of polished low-quality isoforms
M1	254 176	17 304	16 968	336
M2	297 959	21 923	21 611	312

表 5 全长转录本注释统计

Tab. 5 Full-length transcript annotation statistics

功能数据库 database	注释数目/条 no. of annotations
GO	3 163
KEGG	3 253
KOG	3 308
NT	1 952
NR	4 779
SwissProt	3 814
all	5 058

2.7 不同样本间差异转录本表达分析

采用 edgeR 软件分析转录本在各样本中的差异表达情况, 计算出差异表达的 P 值和 FDR 值, 为控制假阳性率, 采用 FDR 值结合 Fold Change 来筛选差异转录本, 筛选条件: $FDR < 0.05$ & $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 。通过筛选, 共得到 57 个差异表

达转录本 (表 7), 其中橘黄色斧足组相对于浅白色组有 34 个转录本表达量上调, 23 个转录本表达量下调。

为判断差异转录本在 6 个样品中的表达模式, 对其进行聚类分析。如图 1 所示, 同组内的差异转录本表达调控模式类似, 2 组间的差异转录本表达模式差异明显, 因此橘黄色斧足和浅白色斧足的 3 个生物学重复可分别聚为一类。

2.8 差异表达转录本 GO 功能注释和 KEGG 富集分析

将筛选出的差异表达转录本进行 Gene Ontology 富集分析, 并统计被极显著富集 ($P < 0.01$) 的各 GO term 中的转录本数 (图 2), 在“生物过程”中显著富集 ($P < 0.05$) 的有翻译、胞质翻译、翻译延伸; 涉及“分子功能”的 term 包括核糖体的结构成分、rRNA 结合、mRNA 结合、翻译延伸因子活性、大核糖体亚单位 rRNA 结合、鸟核苷酸结合、

表 6 二代数据与全长转录本的比对统计表

Tab. 6 Statistical table of comparison between second-generation data and full-length transcripts

样品 samples	总reads数/条 total reads	比对上的reads数/条 (对比率/%) mapped reads (contrast ratio)	唯一比对上的reads数/条 (对比率/%) uniquely mapped (contrast ratio)	多点比对上的reads数/条 (对比率/%) multi mapped (contrast ratio)
D1	54 314 552	39 810 862 (73.30)	3 232 798 (8.12)	36 578 064 (91.88)
D2	51 257 464	37 879 996 (73.90)	2 088 552 (5.51)	35 791 444 (94.49)
D4	46 198 098	30 360 018 (65.72)	3 530 128 (11.63)	26 829 890 (88.37)
L1	46 022 772	33 300 554 (72.36)	3 137 204 (9.42)	30 163 350 (90.58)
L2	50 730 468	39 471 486 (77.81)	2 612 756 (6.62)	36 858 730 (93.38)
L3	50 244 954	38 096 162 (75.82)	2 865 670 (7.52)	35 230 492 (92.48)

表 7 57 个转录本在各样本中的表达量统计

Tab. 7 Expression statistics of 57 transcripts in each sample

转录本 ID transcripts ID	$\log_2(\text{Fold Change})$	P 值 P value	FDR	FPKM					
				D1	D2	D4	L1	L2	L3
M1_1-10k_transcript/1468	-9.332108	0.000138	0.045568	9.633	0.261	17.439	0	0.046	0
M1_1-10k_transcript/8092	-11.11117	5.25E-05	0.027069	7.912	1.394	47.483	0	0	0.027
M1_1-10k_transcript/3712	-10.65543	0.000158	0.049061	76.792	0.261	16.749	0	0	0.036
M1_1-10k_transcript/3042	-12.40455	7.74E-05	0.035758	68.410	0.152	11.537	0	0	0
M1_1-10k_transcript/14673	-12.05496	9.01E-06	0.012031	334.441	21.208	137.141	0	0	0
M1_1-10k_transcript/11421	-10.64489	1.10E-05	0.012031	125.503	42.416	101.546	0	0.093	0
M1_1-10k_transcript/2821	-12.39042	2.98E-06	0.010755	12.587	25.215	46.604	0	0	0
M1_1-10k_transcript/7857	-10.12642	5.53E-05	0.027737	5.738	8.340	17.393	0	0	0
M1_1-10k_transcript/13580	-10.34243	2.35E-05	0.017955	30.546	34.207	39.757	0	0	0
M2_1-10k_transcript/2703	-13.98672	4.09E-05	0.023703	44.205	35.928	51.158	0	0	0
M1_1-10k_transcript/12453	-9.174248	2.62E-05	0.018367	61.016	16.592	38.318	0.159	0	0
M1_1-10k_transcript/12166	-9.625322	9.99E-06	0.012031	71.637	78.235	20.299	0	0	0.116
M1_1-10k_transcript/15379	-9.688905	0.000128	0.043382	32.596	80.282	15.504	0	0	0

· 续表 7 ·

转录本 ID transcripts ID	log ₂ (Fold Change)	P值 P value	FDR	FPKM					
				D1	D2	D4	L1	L2	L3
M1_1-10k_transcript/5345	-9.79549	1.26E-05	0.012424	21.110	57.615	5.348	0.022	0	0
M1_1-10k_transcript/6524	-10.52391	2.52E-05	0.018367	19.069	8.514	6.462	0	0	0
M1_1-10k_transcript/5956	-10.3425	8.94E-05	0.038253	21.496	2.874	2.847	0	0	0
M1_1-10k_transcript/3532	-9.639536	0.000129	0.043382	3.725	9.755	2.475	0	0	0
M1_1-10k_transcript/12928	-11.74575	0.000107	0.041185	0.517	10.147	149.258	0	0	0
M1_1-10k_transcript/9853	-10.4051	0.000143	0.045732	1.035	10.125	35.692	0	0	0
M1_1-10k_transcript/2889	-12.35556	3.32E-05	0.021599	3.142	2.330	63.796	0	0	0
M1_1-10k_transcript/2783	-9.574309	0.000127	0.043382	3.866	4.529	60.779	0	0	0.080
M1_1-10k_transcript/13281	-13.41965	9.44E-05	0.039437	19.069	76.645	608.354	0	0	0
M1_1-10k_transcript/14746	-11.44465	7.83E-06	0.012031	25.108	97.832	226.46	0	0	0
M1_1-10k_transcript/13087	-10.26584	0.000108	0.041185	28.570	338.503	254.557	0	0.290	0
M1_1-10k_transcript/2692	-12.97834	8.25E-05	0.036328	97.328	28.154	0.547	0	0	0
M1_1-10k_transcript/7260	-12.62634	0.000122	0.043382	75.475	115.730	0.052	0	0	0
M1_1-10k_transcript/15235	-12.82219	8.28E-05	0.036328	158.222	1925.780	5.922	0	0	0
M1_1-10k_transcript/9337	-14.21782	4.19E-05	0.023703	333.547	209.882	152.424	0	0	0
M1_1-10k_transcript/5259	-14.65664	3.94E-05	0.023703	153.227	191.940	247.052	0	0	0
M1_1-10k_transcript/16624	-9.828413	0.000107	0.041185	99.643	286.767	51.255	0	0	0.241
M1_1-10k_transcript/12785	-12.75079	8.90E-06	0.012031	73.264	418.131	34.148	0	0	0
M1_1-10k_transcript/16530	-12.98685	1.27E-05	0.012424	1005.024	2786.756	348.332	0.420	0	0
M1_1-10k_transcript/15773	-12.28001	4.56E-06	0.010755	398.674	980.800	72.544	0	0	0
M2_1-10k_transcript/10900	15.367755	3.11E-05	0.021006	0	0	0	169.007	288.898	158.499
M2_1-10k_transcript/20255	12.706787	3.64E-06	0.010755	0	0	0	459.858	310.902	199.881
M2_1-10k_transcript/19413	12.20593	4.81E-06	0.010755	0	0	0.085	204.656	143.195	20.442
M2_1-10k_transcript/4895	14.718109	7.42E-05	0.035722	0	0	0.026	410.977	44.113	284.544
M2_1-10k_transcript/19608	13.030988	0.00014	0.045568	0	0	0	450.167	310.647	0.704
M2_1-10k_transcript/10442	10.802607	9.13E-06	0.012031	0	0	0	10.140	6.793	6.443
M2_1-10k_transcript/6171	11.026606	5.67E-06	0.011059	0	0	0	8.597	4.064	6.576
M2_1-10k_transcript/8907	10.647184	3.79E-05	0.023703	0	0	0	2.542	1.997	13.589
M2_1-10k_transcript/17841	9.6322349	0.00012	0.043382	0	0	0	6.960	12.715	14.240
M2_1-10k_transcript/18427	9.6179511	0.000159	0.049061	0	0	0	6.975	11.542	25.191
M2_1-10k_transcript/8018	12.544365	2.16E-06	0.010755	0	0	0	15.688	27.984	23.783
M2_1-10k_transcript/13478	11.49974	2.32E-06	0.010755	0	0	0	12.530	22.654	20.459
M2_1-10k_transcript/5926	8.6489439	5.01E-05	0.026645	0.056	0	0	2.231	13.098	9.392
M2_1-10k_transcript/15700	12.195752	1.53E-06	0.010755	0	0	0	30.912	53.925	37.907
M2_1-10k_transcript/7939	13.662566	4.62E-05	0.025336	0	0	0	32.114	24.652	84.832
M2_1-10k_transcript/1688	13.16161	1.06E-05	0.012031	0	0	0	18.128	15.815	17.082
M2_1-10k_transcript/2389	13.207177	1.36E-05	0.012531	0	0	0	30.035	16.384	12.253
M2_1-10k_transcript/6652	13.233345	1.50E-05	0.013013	0	0	0	48.077	32.907	15.033
M2_1-10k_transcript/7649	11.911408	4.90E-06	0.010755	0	0	0	22.539	3.077	13.928
M1_1-10k_transcript/9947	11.696458	1.61E-05	0.013013	0	0	0	61.845	1.823	29.299
M2_1-10k_transcript/4883	12.952219	7.53E-05	0.035722	0	0	0	22.488	0.221	43.459
M2_1-10k_transcript/2748	11.542746	1.63E-05	0.013013	0	0	0	3.332	17.545	0.606
M2_1-10k_transcript/3917	11.317641	0.000116	0.043119	0	0	0	9.625	10.160	0.009
M2_1-10k_transcript/15922	11.135863	9.67E-05	0.03945	0	0	0	0.377	61.948	5.213

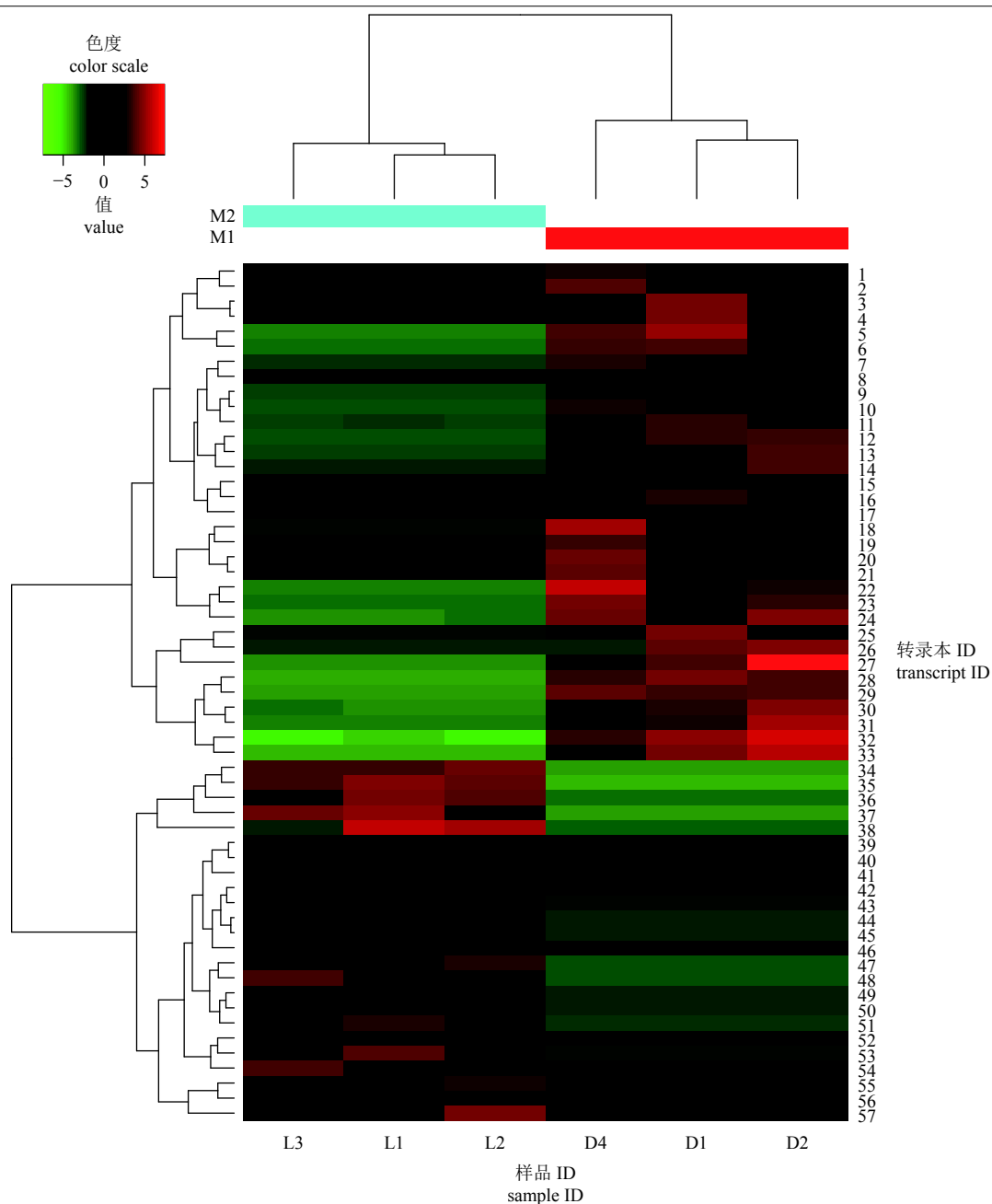


图 1 差异表达转录本的表达模式聚类图

Fig. 1 Cluster analysis of differentially expressed transcripts

1. M1_1-10k_transcript/1468, 2. M1_1-10k_transcript/8092, 3. M1_1-10k_transcript/3712, 4. M1_1-10k_transcript/3042, 5. M1_1-10k_transcript/14673, 6. M1_1-10k_transcript/11421, 7. M1_1-10k_transcript/2821, 8. M1_1-10k_transcript/7857, 9. M1_1-10k_transcript/13580, 10. M2_1-10k_transcript/2703, 11. M1_1-10k_transcript/12453, 12. M1_1-10k_transcript/12166, 13. M1_1-10k_transcript/15379, 14. M1_1-10k_transcript/5345, 15. M1_1-10k_transcript/6524, 16. M1_1-10k_transcript/5956, 17. M1_1-10k_transcript/3532, 18. M1_1-10k_transcript/12928, 19. M1_1-10k_transcript/9853, 20. M1_1-10k_transcript/2889, 21. M1_1-10k_transcript/2783, 22. M1_1-10k_transcript/13281, 23. M1_1-10k_transcript/14746, 24. M1_1-10k_transcript/13087, 25. M1_1-10k_transcript/2692, 26. M1_1-10k_transcript/7260, 27. M1_1-10k_transcript/15235, 28. M1_1-10k_transcript/9337, 29. M1_1-10k_transcript/5259, 30. M1_1-10k_transcript/16624, 31. M1_1-10k_transcript/12785, 32. M1_1-10k_transcript/16530, 33. M1_1-10k_transcript/15773, 34. M2_1-10k_transcript/10900, 35. M2_1-10k_transcript/20255, 36. M2_1-10k_transcript/19413, 37. M2_1-10k_transcript/4895, 38. M2_1-10k_transcript/19608, 39. M2_1-10k_transcript/10442, 40. M2_1-10k_transcript/6171, 41. M2_1-10k_transcript/8907, 42. M2_1-10k_transcript/17841, 43. M2_1-10k_transcript/18427, 44. M2_1-10k_transcript/8018, 45. M2_1-10k_transcript/13478, 46. M2_1-10k_transcript/5926, 47. M2_1-10k_transcript/15700, 48. M2_1-10k_transcript/7939, 49. M2_1-10k_transcript/1688, 50. M2_1-10k_transcript/2389, 51. M2_1-10k_transcript/6652, 52. M2_1-10k_transcript/7649, 53. M1_1-10k_transcript/9947, 54. M2_1-10k_transcript/4883, 55. M2_1-10k_transcript/2748, 56. M2_1-10k_transcript/3917, 57. M2_1-10k_transcript/15922

GTP 结合；涉及“细胞组分”的 term 包括胞质大核糖体亚单位、核糖体、膜的组成部分、核糖体亚基、真核生物翻译延伸因子 1 复合体、细胞内的核糖核蛋白复合体、核糖核蛋白复合体，推测这些功能或过程可能影响着织锦巴非蛤的斧足颜色。

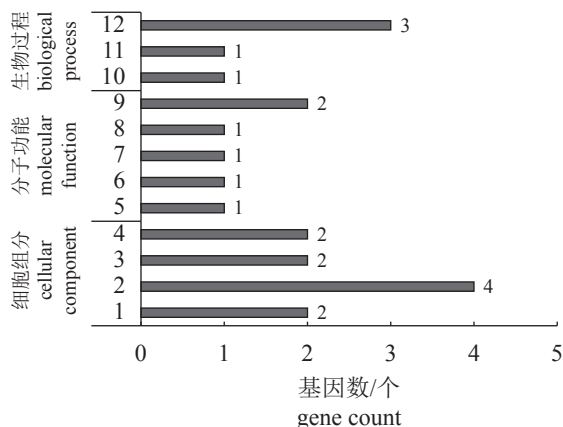


图 2 差异表达转录本 GO 富集柱状图

1. 核糖体亚基, 2. 膜的组成部分, 3. 核糖体, 4. 胞质大核糖体亚基, 5. 大核糖体亚单位 rRNA 结合, 6. 翻译延伸因子活性, 7. mRNA 结合, 8. rRNA 结合, 9. 核糖体的结构成分, 10. 翻译延伸, 11. 胞质翻译, 12. 翻译

Fig. 2 GO enrichment histogram of differentially expressed transcripts

1. ribosomal subunit, 2. integral component of membrane, 3. ribosome, 4. cytosolic large ribosomal subunit, 5. large ribosomal subunit rRNA binding, 6. translation elongation factor activity, 7. mRNA binding, 8. rRNA binding, 9. structural constituent of ribosome, 10. translational elongation, 11. cytoplasmic translation, 12. translation

为更好地了解差异表达转录本的生物学功能和作用, 进一步对其进行 KEGG 富集分析。结果表明, 织锦巴非蛤斧足颜色差异转录本显著富集 ($P < 0.05$) 的相关通路有近端小管碳酸氢盐再生、脂肪细胞因子信号通路、FoxO 信号通路、胰岛素信号转导通路、丙酮酸代谢、PPAR 信号通路、柠檬酸循环、PI3K-AKT 信号通路和糖酵解/糖原异生通路。

2.9 差异表达转录本的 qRT-PCR 验证

随机选取 12 个与斧足颜色相关的差异表达转录本, 设计 qRT-PCR 引物对测序的 6 个斧足样本进行定量分析以验证转录组测序数据和分析的可靠性。如图 3 所示, 基于 qRT-PCR 获得的差异转录本表达量趋势与转录组测序结果基本一致, 这表明通过测序分析所鉴定的差异表达转录本是相对可靠的, 同时也可以从这些差异表达转录本中做出一些合理的推论。

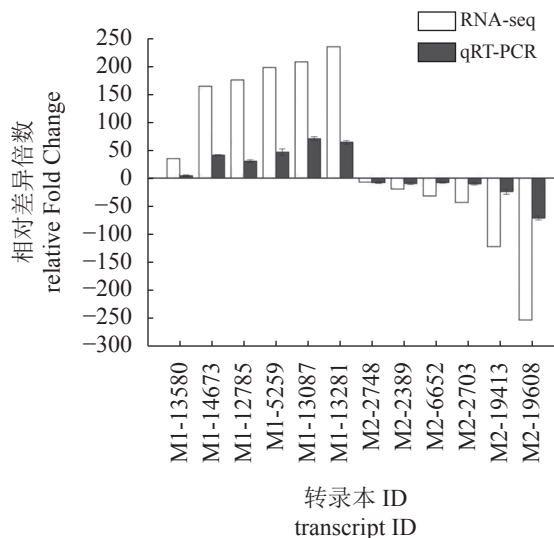


图 3 部分差异表达转录本的测序结果与 qRT-PCR 结果对比

Fig. 3 Results comparison of partially differentially expressed transcripts transcriptome and qRT-PCR

3 讨论

近年来, 随着转录组技术的不断发展, 有关水产动物体色、壳色的转录组差异表达分析应用越来越广泛。在华贵栉孔扇贝中, 壳色和闭壳肌颜色呈现多态性, 棕色外壳的个体, 闭壳肌颜色通常是白色的, 橙黄色外壳的个体, 闭壳肌颜色也为橙黄色, 并且橙黄色的华贵栉孔扇贝个体所含类胡萝卜素含量显著高于棕色个体中的类胡萝卜素含量^[11]。在虾夷扇贝^[12]、波纹巴非蛤^[13]中也是类似的分布规律。推测织锦巴非蛤斧足颜色的差异也可能与类胡萝卜素含量的高低有关。

肉质颜色是一个复杂的数量性状, 受到环境和很多基因的共同影响, 它的形成可能涉及许多细胞内信号通路的共同反应^[14-15]。为了更好地了解基因的生物学功能和相互作用, 对这些差异表达转录本进行了 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。在 KEGG 富集分析中, 有 17 个差异表达转录本富集在 KEGG 通路中, 在这些通路中, “FoxO 信号通路”、“PI3K-AKT 信号通路”、“胰岛素信号通路”、“糖酵解/糖原异生”、“PPAR 信号通路”、“脂肪细胞因子信号通路”包含较多差异表达转录本, 在 Li 等^[14]对猪肉颜色进行转录组差异表达分析时, 曾推测“胰岛素信号通路”、“PPAR 信号通路”、“糖酵解/糖原异生”等途径可能形成了一个涉及到肉质颜色检测的潜在调控网络。在以往的研究中, PPAR 信号通路与哺乳动物的肉

品质显著相关,越来越多的证据表明,脂肪酸的生物合成和代谢受到过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)的调节,而这主要是通过PPAR信号通路的转录组水平^[16]。并且在“海大金贝”和普通华贵栉孔扇贝进行蛋白组学、转录组学比较时,发现PPARs转录因子在类胡萝卜素含量差异表达中起关键作用^[6],PPARs调节了“海大金贝”体内的脂质代谢和葡萄糖稳态等细胞过程,促进了参与类胡萝卜素代谢的基因(*sr-bi*、*bcmo1*)表达,与PPARs相关的蛋白质在mRNA表达水平上均是上调表达。但在本研究中,“PPAR信号通路”涉及的差异表达基因均是下调表达(M2_1-10k_transcript/2389、M2_1-10k_transcript/2748、M2_1-10k_transcript/6652),因此具体调控途径还需进一步探索。FoxO转录因子家族调节细胞中基因的表达,包括细胞凋亡、细胞周期控制、葡萄糖代谢,氧化应激抗性等,FoxO蛋白的中心调节机制是磷脂酰肌醇3-激酶下游的丝氨酸-苏氨酸激酶(AKT/PKB)的磷酸化(PI3K-AKT信号通路),来响应胰岛素或其他生长因子的变化。在本研究结果中,PI3K-AKT信号通路包含的差异表达转录本又影响着糖酵解/糖原异生通路,而糖酵解潜力和游离葡萄糖含量与肉质颜色显著相关^[17],所以初步猜测本研究中的这些通路可能与斧足颜色形成相关。

肌钙蛋白是由肌钙蛋白T、肌钙蛋白I、肌钙蛋白C这3种亚单位组成的络合物,与原肌凝蛋白和肌纤蛋白构成肌原纤维中的细肌丝,而肌原纤维蛋白质是构成肌肉的重要成分,因此其状态及变化是决定肉质的基本因素^[18]。对猪肉不同肉质颜色进行转录组差异表达分析表明,“肌钙蛋白复合物”和“肌钙蛋白T结合”等GO term可能参与肉类颜色形成有关的途径^[14],肌纤维类型之间的差异是决定肉色的关键因素^[19]。本研究鉴定到一个肌钙蛋白转录本(M1_1-10k_transcript/13281),其在橘黄色斧足中的表达量显著高于浅白色斧足,可能与织锦巴非蛤斧足颜色的形成有关。肌酸-磷酸转移酶家族(M1_1-10k_transcript/12785)在结构上包括肌酸激酶和精氨酸激酶,前者主要存在于脊椎动物中,而后者则分布在无脊椎动物的组织中,这类激酶可通过酶-特异肌基受体和ATP之间磷酸基团的可逆转移而合成N-磷酸化的肌基化合物,使ATP保持稳定水平^[20]。在本研究中发现,属于无脊椎动物的织锦巴非蛤,在其橘黄色斧足中AK的表达上调,这可能与氧化还原状态有关,

肌红蛋白的氧化还原状态对肉质颜色起着关键作用^[14]。此外,在橘黄色斧足中转录激活因子4(ATF4)也呈上调表达,ATF4是线粒体应激调控的关键基因,而O₂的代谢主要发生在线粒体上^[21],这都反映出AK在织锦巴非蛤斧足颜色调控中发挥着重要的作用。

4 结论

本研究首次应用第二代和第三代测序技术对织锦巴非蛤不同颜色的斧足进行了全长转录组测序、分析、注释及差异表达分析。结果表明,橘黄色斧足组相对于浅白色斧足组有34个差异转录本表达量上调,23个差异转录本表达量下调,这些差异表达转录本参与到PPAR、PI3K-AKT和FoxO等信号通路,进而形成影响斧足颜色的潜在调控网络。其中PPAR调节着脂肪酸的生物合成和代谢,肌钙蛋白是肌肉的重要组成成分,AK参与了色素富集过程中的能量供应。这些结果表明,织锦巴非蛤可通过这些基因的表达量变化来强化自身对类胡萝卜素的富集能力。本研究可为进一步发掘斧足颜色相关基因、解析颜色差异的分子机制提供参考。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献(References):

- [1] 纪燕如,林志华,伍荣聪,等.我国东南沿海5个织锦巴非蛤地理群体的形态差异分析[J].*热带生物学报*,2011,2(3):219-225.
Ji Y R, Lin Z H, Wu R C, et al. Morphological variation analysis of five different geographic populations of *Paphia textile* along South China Sea[J]. *Journal of Tropical Organisms*, 2011, 2(3): 219-225 (in Chinese).
- [2] 栗志民,刘志刚,韩伟贤.织锦巴非蛤稚贝盐度适应性研究[J].*海洋科学*,2011,35(10):96-102.
Li Z M, Liu Z G, Han W X. Salinity adaptability of *Paphia textzle* spats at different salinity levels[J]. *Marine Sciences*, 2011, 35(10): 96-102 (in Chinese).
- [3] 肖湘,方明英,张尔贤,等.缢蛏、织锦巴非蛤、二色裂江珧清除氧自由基作用研究[J].*中国海洋药物*,2002,21(3):5-7.
Xiao X, Fang M Y, Zhang E X, et al. Study on the effects of *Sinonovacula constricta* Lamarck, *Paphia textzle* Gmelin and *Pinna bicolor* Gmelin scavenging oxygen free radical[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*,

- 2002, 21(3): 5-7 (in Chinese).
- [4] Clydesdale F M. Color perception and food quality[J]. *Journal of Food Quality*, 1991, 14(1): 61-74.
- [5] Liu H L, Zheng H P, Zhang H K, *et al.* A de novo transcriptome of the noble scallop, *Chlamys nobilis*, focusing on mining transcripts for carotenoid-based coloration[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 44.
- [6] 任晓亮, 侯睿, 王珊, 等. 控制虾夷扇贝闭壳肌积累类胡萝卜素相关基因的筛查[J]. *中国海洋大学学报*, 2012, 42(9): 41-47.
- Ren X L, Hou R, Wang S, *et al.* Identification of genes relating to carotenoids accumulation in adductor muscles of Yesso scallops (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(9): 41-47 (in Chinese).
- [7] Zhang Y Y, Zhang L L, Sun J, *et al.* Proteomic analysis identifies proteins related to carotenoid accumulation in Yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*)[J]. *Food Chemistry*, 2014, 147: 111-116.
- [8] 李庆昌, 刘坦, 陈小明, 等. 织锦巴非蛤斧足颜色与总类胡萝卜素含量相关分析[J]. *海洋科学*, 2016, 40(10): 120-125.
- Li Q C, Liu T, Chen X M, *et al.* Correlation analysis of the color and total carotenoid content in *Paphia textile* foot tissue[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(10): 120-125 (in Chinese).
- [9] Westbrook C J, Karl J A, Wiseman R W, *et al.* No assembly required: full-length MHC class I allele discovery by PacBio circular consensus sequencing[J]. *Human Immunology*, 2015, 76(12): 891-896.
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Zheng H P, Liu H L, Zhang T, *et al.* Total carotenoid differences in scallop tissues of *Chlamys nobilis*, (Bivalve: Pectinidae) with regard to gender and shell colour[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(4): 1164-1167.
- [12] Li N, Hu J J, Wang S, *et al.* Isolation and identification of the main carotenoid pigment from the rare orange muscle of the Yesso scallop[J]. *Food Chemistry*, 2010, 118(3): 616-619.
- [13] 李庆昌, 邓素贞, 刘贤德, 等. 雌雄波纹巴非蛤不同组织中总类胡萝卜素含量比较分析[J]. *海洋科学*, 2017, 41(11): 102-106.
- Li Q C, Deng S Z, Liu X D, *et al.* Analysis of total carotenoid content in different tissues of male and female *Paphia undulate*[J]. *Marine Sciences*, 2017, 41(11): 102-106 (in Chinese).
- [14] Li B J, Dong C, Li P H, *et al.* Identification of candidate genes associated with porcine meat color traits by genome-wide transcriptome analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 35224.
- [15] Fan B, Glenn K L, Geiger B, *et al.* Investigation of QTL regions on chromosome 17 for genes associated with meat color in the pig[J]. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 2008, 125(4): 240-247.
- [16] He K, Wang Q S, Wang Z, *et al.* Association study between gene polymorphisms in PPAR signaling pathway and porcine meat quality traits[J]. *Mammalian Genome*, 2013, 24(7-8): 322-331.
- [17] Mancini R A, Hunt M C. Current research in meat color[J]. *Meat Science*, 2005, 71(1): 100-121.
- [18] Wood J D, Enser M, Fisher A V, *et al.* Manipulating meat quality and composition[J]. *Proceedings of the Nutrition Society*, 1999, 58(2): 363-370.
- [19] Joo S T, Kim G D, Hwang Y H, *et al.* Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics[J]. *Meat Science*, 2013, 95(4): 828-836.
- [20] 姚翠鸾, 王志勇, 相建海. 甲壳动物精氨酸激酶的结构与功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(3): 203-208.
- Yao C L, Wang Z Y, Xiang J H. Structure and function of arginine kinase in crustacean[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 24(3): 203-208 (in Chinese).
- [21] Quirós P M, Prado M A, Zamboni N, *et al.* Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals[J]. *Journal of Cell Biology*, 2017, 216(7): 2027-2045.

Transcriptome analysis of *Paphia textile* with different foot colors

ZENG Qingmin¹, ZHAO Hongbo², DENG Suzhen², ZHANG Xiaoying², LIU Xiande^{2*}

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province,
Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, the Ministry of Agriculture and Rural Affairs,
Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: This study aimed to explore the molecular mechanism of foot color difference to guide the selective breeding of high-quality *Paphia textile*. In this study, the foot transcriptomes of *P. textile* with different colors were analyzed by the second and third-generation sequencing technology. Analysis of gene differential expression was also performed in the orange and the white feet of *P. textile*. The second-generation sequencing results showed that a total of 44.82 Gb of clean data were obtained from six samples, GC content was 35.30%-38.21%, and the percentage of Q30 base was 94.43% or above. The results of third-generation sequencing showed that the orange foot group and light white group obtained 16 968 and 21 611 high quality transcripts, respectively. Among them, high quality transcript sequences were compared with the major databases, 5 058 full-length transcripts with annotated information were obtained. Three generation full-length transcripts were regarded as reference sequences, and the second-generation data were aligned back to the reference sequence. A total of 57 differentially expressed transcripts were obtained, including 34 up-regulated and 23 down-regulated genes in orange group. 12 randomly selected transcripts were validated with realtime fluorescence quantitative PCR (qPCR), which showed that they were consistent with the qPCR analysis results. Subsequently, through bioinformatics analysis, it was found the regulation of foot color was affected by fatty acid biosynthesis and metabolism, muscle composition, energy metabolism energy metabolism in *P. textile*. Among them, peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs) regulated fatty acid biosynthesis and metabolism. Troponin is an important component of muscle. Arginine kinase (AK) is involved in energy supply during pigment deposition. It is speculated that PPARs, Troponin, and AK play an important role in the pigment deposition. The results of this study may pave the way for further exploring the molecular mechanism of color-related genes and assist selective breeding practices in *P. textile*.

Key words: *Paphia textile*; carotenoids; foot; transcriptome sequencing; differentially expressed transcripts

Corresponding author: LIU Xiande. E-mail: xdliu@jmu.edu.cn

Funding projects: National Key R & D Program "Blue Granary Science and Technology Innovation" (2018YFD0901404)