

## 脊尾白虾对低盐胁迫响应的转录组学分析

沈 晔<sup>1</sup>, 王兴强<sup>1</sup>, 曹 梅<sup>1</sup>, 郑年昊<sup>1</sup>, 陈百尧<sup>2</sup>, 秦传新<sup>3</sup>

(1. 江苏海洋大学海洋生命与水产学学院, 江苏 连云港 222005; 2. 连云港市农业农村局, 江苏 连云港 222005;  
3. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

**摘要:** 转录组测序可在各种环境条件下对物种进行高通量测序, 通过基因结构分析和功能注释, 探讨特定条件下相关基因的功能和表达情况。该研究分别获取低盐胁迫组 (盐度 0.2) 和自然海水组 (盐度 31) 脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 样品, 通过 Illumina 平台进行转录组测序, 获得 13.92 Gb 高质量测序数据, 组装得到 111 618 条转录本和 72 734 条 Unigenes, 其中有 22 879 条 Unigenes 得到注释, 比对到 Nr 数据库的 Unigenes 为 21 931 条; 筛选出 1 492 条脊尾白虾低盐胁迫差异显著表达基因, 包括 829 条上调基因和 663 条下调基因, 其中有 810 条差异表达基因得到注释。通过差异表达基因 GO 功能注释和富集分析及 KEGG 通路富集分析, 锁定大量脊尾白虾在自然海水和淡水环境下的差异表达基因, 为深入探讨脊尾白虾在低盐胁迫条件下的生理保护机制提供了技术支撑。

**关键词:** 脊尾白虾; 低盐胁迫; 转录组分析; 差异表达基因

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



## Transcriptome analysis of *Exopalaemon carinicauda* under low salinity stress

SHEN Ye<sup>1</sup>, WANG Xingqiang<sup>1</sup>, CAO Mei<sup>1</sup>, ZHENG Nianhao<sup>1</sup>, CHEN Baiyao<sup>2</sup>, QIN Chuanxin<sup>3</sup>

(1. College of Marine Life and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2. Lianyungang Agricultural and Rural Bureau, Lianyungang 222005, China; 3. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** Transcriptome sequencing can be used for high-throughput sequencing of species under various environmental conditions. We explored the function and expression of related genes under specific conditions by gene structure analysis and gene function annotation. *E. carinicauda* samples at freshwater (salinity 0.2) and natural seawater (salinity 31) were sequenced by Illumina platform, and 13.92 Gb high-quality sequencing data was obtained. 111 618 transcripts and 72 734 unigenes were assembled. A total of 22 879 unigenes were annotated, of which 21 931 were compared to the Nr database. 1 492 differentially expressed genes were screened, including 829 up-regulated genes and 663 down-regulated genes, 810 of which were annotated. According to the GO function annotation, enrichment analysis and enrichment analysis of KEGG pathway of differentially expressed gene, we excavated differentially expressed genes of the natural seawater and freshwater environments, which provides technical support for further research on the physiological protection mechanism of *E. carinicauda* under low salinity stress.

收稿日期: 2019-12-31; 修回日期: 2020-04-27

资助项目: 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (SJCX18\_0927); 江苏省海洋生物技术重点实验室开放基金 (HS16005); 广东省渔业生态环境重点实验室开放基金 (FEEL\_2019\_3); 连云港市“海燕计划”

作者简介: 沈 晔 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产动物增殖。E-mail: 1303768939@qq.com

通信作者: 王兴强 (1975—), 男, 博士, 教授, 从事养殖生态学研究。E-mail: wangxingqiang@jou.edu.cn

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; Low salinity stress; Transcriptome analysis; Differentially expressed gene

近年来, 虾类养殖已成为水产养殖发展较为迅速的产业之一<sup>[1]</sup>。脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)是黄、渤海沿岸主要经济虾类之一, 具有广盐、广温性, 抗病力和繁殖力较强等优点, 已逐渐成为沿海滩涂混合养殖的重要品种; 脊尾白虾对低盐耐受性非常强, 甚至可以在淡水中生活, 是目前低盐混养的重要虾类品种<sup>[2-3]</sup>。水体是虾类健康养殖的关键因素, 水体生态环境的变化会影响虾类的生长和存活。急性低盐胁迫对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)和东方新糠虾(*Neomysis orientalis*)等的生长和成活率均有显著影响<sup>[4-7]</sup>。低盐环境下, 凡纳滨对虾和克氏原螯虾的肝胰腺均受到损伤, 抗氧化能力和免疫酶活力下降, 并使凡纳滨对虾卵巢发育相关基因受到抑制<sup>[8-10]</sup>。免疫相关基因C型凝集素在斑节对虾肝胰腺和肠中的表达量显著上升, 酚氧化酶原基因在脊尾白虾血淋巴和鳃组织中表达量显著升高, 参与低盐胁迫的应激反应<sup>[11-13]</sup>。

转录组测序可在各种环境条件下对物种进行高通量测序, 通过测序结果进行基因结构分析和基因功能注释, 分析特定条件下相关基因的表达情况, 以揭示其代谢网络及调控响应机理<sup>[14-15]</sup>。转录组测序已在临床诊断、农业基因组学和法医学科学等多个领域, 发挥着越来越重要的作用, 其测序成本也大幅降低<sup>[16]</sup>。目前高通量转录组测序技术在鱼类、贝类和虾蟹类中均有应用, 主要集中在各种胁迫对水产动物生理机制的影响、环境胁迫相关基因筛选、生长发育相关基因筛选、饲料成分对水产动物转录组的影响、微卫星育种标记开发等<sup>[17-21]</sup>。王日芳<sup>[22]</sup>进行脊尾白虾转录组测序, 开发了33个微卫星标记进行遗传多样性分析, 发现3个近交家系的近交程度较高。孙政<sup>[23]</sup>利用新一代测序技术(ROCHE454)对脊尾白虾胚胎发育不同时期以及成虾应对各种病原刺激时的转录组进行测序, 发现成虾在应对各种病原刺激时免疫相关基因表达量增加, 在胚胎阶段参与外皮发生的基因十分活跃。冯宁宁<sup>[24]</sup>对脊尾白虾WSSV潜伏组与急性感染组的转录组进行测序, 筛选出濒死与对照群体中的差异表达基因。为探索脊尾白虾低盐度人工养殖的可能

性, 筛选脊尾白虾在自然海水和淡水环境下的差异表达基因, 本研究运用第二代Illumina测序技术对脊尾白虾进行了转录组测序, 为进一步研究其在低盐环境下的调控机理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验设计

实验在江苏海洋大学海水养殖动物病害与生态免疫学实验室进行, 实验用脊尾白虾来自连云港南极路水产市场, 规格整齐、体质健壮, 养殖1周以适应实验室环境, 暂养水体温度24~26℃、盐度31、pH 8.25、溶解氧质量浓度7.6~8.1 mg·L<sup>-1</sup>。

实验1开始时随机挑选脊尾白虾120尾, 平均湿质量(4.12±0.56)g, 分为自然海水(盐度31)和低盐胁迫(盐度0.2)2个处理组, 每组设3个重复, 共6个水族箱, 每个水族箱(水体积约30L)放养20尾脊尾白虾, 人工充氧。胁迫约5.5h后虾体开始从尾部变白, 约6h后虾开始侧卧游动, 估计此时脊尾白虾处于昏厥状态。为确保样品质量, 低盐胁迫组脊尾白虾侧卧约5min开始取样(低盐胁迫约6h), 海水组与低盐胁迫组每个水族箱分别选取5尾, 整虾速冻于液氮中, 备用。实验2设计同上, 随机挑选脊尾白虾120尾, 分别在第0、第0.5、第1、第2、第4和第6小时, 从每个水族箱取出2尾, 解剖出肌肉、鳃和肝胰脏于液氮中速冻保存, 备用。实验2样品RNA, 用实时定量反转录试剂盒制成cDNA备用。

### 1.2 方法

1.2.1 RNA提取与文库构建 将冻存的实验1低盐胁迫组和海水组样品分别于液氮中全虾研磨混合均匀后进行脊尾白虾总RNA提取, 检测RNA样品纯度、浓度和完整性。随后用带有Oligo(dT)的磁珠富集脊尾白虾mRNA, 加入破碎液将mRNA进行随机打断, 以mRNA为模板, 反转录合成双链cDNA链, 利用AMPure XP beads纯化cDNA, 纯化的双链cDNA再进行末端修复、加尾并连接测序接头, 然后用AMPure XP beads进行片段大小选择, 最后通过PCR富集构建cDNA文库, 检测文库的浓度和插入片段大小, 并通过Q-PCR准确定量有效浓度, 以保证文库质量。常规方法提取实验2样品RNA, 用实时定量反转录试剂盒制成cDNA备用。

1.2.2 转录组测序与分析 实验 1 获得的检测合格的 cDNA 文库送样到北京百迈客生物科技有限公司进行 HiSeq2500 高通量测序, 测序读长为 PE125。对原始数据进行过滤, 滤掉原始数据中的接头序列和低质量读数, 获得高质量的数据后, 通过 Trinity 软件进行序列组装得到脊尾白虾的 Unigene 库。使用 BLAST 软件将 Unigene 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG 和 KEGG 等多个数据库进行比对得到 Unigene 注释信息。将低盐胁迫组和海水组高质量的测序数据与组装得到的 Unigene 库进行序列比对, 使用 EBSeg 进行差异表达分析, 将错误发现率 FDR (False discovery rate)<0.01 且差异倍数 FC (Fold change)≥2 作为筛选标准, 最终得到自然海水组和低盐胁迫组样品间的差异表达基因<sup>[25-27]</sup>, 进行差异表达基因的功能注释和富集分析。利用 topGO 软件对海水组和低盐胁迫组样品间差异表达基因进行 GO 富集分析, 以有向无环图展示各富集节点在 GO 体系中的关联, 挖掘显著富集节点中的差异表达基因, 分析差异表达基因可能行使的分子功能。以差异表达基因钠/唾液酸共转运体 (Sodium/sialic acid cotransporter, Sialin) 为例, 对所在的溶酶体信号通路进行展示并分析。

1.2.3 差异表达基因的筛选与验证 从转录组分析得到的自然海水组和低盐胁迫组样品间差异表达基因中, 挑选生殖蛋白 A (Reproductive-related protein A, RPA)、ETS 转录因子 4 (ETS-related transcription factor 4, Elf 4)、钠/唾液酸共转运体、胰蛋白酶 (Trypsin)、Smads 蛋白 4 (Mothers against decapentaplegic protein 4, SMAD 4)、钙结合蛋白 (Calcium-binding protein, CBP) 和 α-葡萄糖苷酶 (Alpha-glucosidase, AGC) 等 7 条差异表达基因进行引物设计, 以实验 2 中反转录得到的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 方法进行验证, 表 1 为验证引物序列, 其中 Actin 为内参基因。利用 SPSS 11.0 软

| 表1 RT-PCR验证引物                                           |                                 |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------|
| Table 1 Primers for real-time quantitative verification |                                 |
| 引物名称<br>Primer name                                     | 引物序列 (5'-3')<br>Primer sequence |
| Actin F                                                 | CCGAGACATCAAGGAGAAGC            |
| Actin R                                                 | ATACCGCAAGATTCCATACCC           |
| RPA RT F                                                | GGAAATGCCAACACCTACGC            |
| RPA RT R                                                | TCCACGTAGCTTCTCTGAGC            |
| Elf 4 RT F                                              | ACATTGAGGAGCTGGATCGC            |
| Elf 4 RT R                                              | AGGCGAACTCTGAATGACGG            |
| Sialin RT F                                             | TTAGTGCATGGAGGCTGGTATT          |
| Sialin RT R                                             | ATTGACGGCTACGTGTTGAGGT          |
| Trypsin RT F                                            | CGTCCTCACTTGTCTCTCTGA           |
| Trypsin RT R                                            | TGCCGTTACCTAATGTCTGGTT          |
| SMAD 4 RT F                                             | CTGTACGGTTGATGGTTACGT           |
| SMAD 4 RT R                                             | CTTGCTCGGTCACTCTGCTCT           |
| CBP RT F                                                | CTCAAGAAGGGCACAGGATT            |
| CBP RT R                                                | TACCCTGAGTCATGGAAGTGC           |
| AGC RT F                                                | TCACCTTCTGCCATACTTATACTCT       |
| AGC RT R                                                | TCAGCACCTCGTAACTTCCTC           |

注: RPA. 生殖蛋白 A; Elf 4. ETS 转录因子 4; Sialin. 钠/唾液酸共转运体; SMAD 4. Smads 蛋白 4; CBP. 钙结合蛋白; AGC. α-葡萄糖苷酶

Note: RPA. Reproductive-related protein A; Elf 4. ETS-related transcription factor; Sialin. Sodium/sialic acid cotransporter; SMAD 4. Mothers against decapentaplegic protein 4; CBP. Calcium-binding protein; AGC. Alpha-glucosidase

件进行统计分析,  $P<0.05$  表示差异显著。

2 结果

2.1 测序结果及产出质量

运用 Illumina HiSeq2500 高通量测序共得到 13.92 Gb 高质量数据, 海水组与低盐胁迫组样品 Q30 碱基百分比不小于 87.93% (表 2), 质量较高。

| 表2 低盐胁迫组与海水组数据产出质量                                            |                    |                     |                      |                                   |
|---------------------------------------------------------------|--------------------|---------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Table 2 Data output quality of freshwater and seawater groups |                    |                     |                      |                                   |
| 样品<br>Sample                                                  | 总读数<br>Read Number | 总碱基数<br>Base Number | GC含量<br>GC Content/% | Q30碱基百分比<br>Q30 base percentage/% |
| 低盐胁迫组 (盐度0.2) Low salinity stress group (Salinity 0.2)        | 25 971 965         | 6 540 875 181       | 44.07                | 88.79                             |
| 海水组 (盐度31) Seawater group (Salinity 31)                       | 29 309 634         | 7 381 520 261       | 44.14                | 87.93                             |

注: Q30 碱基百分比指质量值大于或等于 30 的碱基所占的百分比, 而 Q30 对应的碱基识别出错的概率为 1/1 000

Note: Q30 base percentage refers to the percentage of base with quality score greater than or equal to 30, and the probability of incorrect base call corresponding to Q30 is 1/1 000.

测序数据组装共得到 111 618 条转录本和 72 734 条 Unigene，转录本与 Unigene 的 N50 分别为 2 341 和 1 502。Unigene 平均长度为 951.16，其中长度在 300~500 bp 的占比最高 (47.56%)，长度在 1 kb 以上的占 24.93% (表 3)。

2.2 Unigenes 功能注释

将 Unigene 序列与各数据库进行比对，获得 Unigene 注释信息。脊尾白虾 2 个样品共有 72 734 个 Unigene，通过筛选最终获得 22 879 条有注释信息的 Unigene，约 31.45%，其中有 21 931 条比对到 Nr 数据库 (表 4)。

表3 组装结果统计

Table 3 Assembly results

| 长度范围<br>Length range/bp | 转录本<br>Transcript | 单基因簇<br>Unigene |
|-------------------------|-------------------|-----------------|
| 300~500                 | 43 156 (38.66%)   | 34 590 (47.56%) |
| 500~1 000               | 29 350 (26.30%)   | 20 011 (27.51%) |
| 1 000~2 000             | 18 777 (16.82%)   | 10 181 (14.00%) |
| >2 000                  | 20 335 (18.22%)   | 7 952 (10.93%)  |
| 总数 Total number         | 111 618           | 72 734          |
| 总长度 Total length        | 142 324 737       | 69 181 596      |
| N50长度 N50 length        | 2 341             | 1 502           |
| 平均长度 Mean length        | 1 275 11          | 951.16          |

表4 Unigene注释统计表

Table 4 Unigene annotation statistics

| 数据库<br>Database | Unigene数量<br>Number of annotated unigene | 长度≥300 nt的Unigene数量<br>Number of Unigene whose length≥300 nt | 长度≥1 000 nt的Unigene数量<br>Number of Unigene whose length≥1 000 nt |
|-----------------|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| COG             | 7 035                                    | 7 035                                                        | 4 381                                                            |
| GO              | 9 100                                    | 9 100                                                        | 5 046                                                            |
| KEGG            | 6 645                                    | 6 645                                                        | 4 137                                                            |
| KOG             | 14 515                                   | 14 515                                                       | 8 732                                                            |
| Pfam            | 15 403                                   | 15 403                                                       | 9 720                                                            |
| Swiss-Prot      | 14 940                                   | 14 940                                                       | 9 093                                                            |
| Nr              | 21 931                                   | 21 931                                                       | 11 913                                                           |
| All             | 22 879                                   | 22 879                                                       | 12 058                                                           |

2.2.1 Nr 数据库注释 蚤状溞 (*Daphnia pulex*) 的同源序列最多，2 143 条，占注释序列总数的 9.77%；其次为赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*) 1 157 条，文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 987 条，紫色球海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 927 条，虱子 (*Pediculus humanus*) 755 条，小头虫 (*Capitella teleta*) 693 条，囊舌虫 (*Saccoglossus kowalevskii*) 618 条，牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 569 条，丽蝇蛹集金小蜂 (*Nasonia vitripennis*) 562 条，海兔 (*Aplysia californica*) 550 条和其他物种 12 813 条。

2.2.2 GO 功能分类 GO 功能注释结果见图 1，共有 9 100 条 Unigenes 被注释分类，从细胞组分可细分为 15 类，占比最多的是细胞组成 (31.50%)，其次为细胞 (31.12%)。从分子功能细分为 16 类，催化活性类包含 Unigenes 最多 (49.45%)，结合次之 (45.13%)。依据其参与的生物学过程可细分为 22 类，代谢过程类包含 Unigenes 最多 (55.59%)，细胞过程类次之 (49.26%)。

2.2.3 COG 功能分类 通过与 COG 数据库进行比对，22 879 条 Unigenes 中有 7 035 条 (30.75%) 比对到了同源序列，共包含 9 379 条功能注释信息，分布于 25 个大类 (图 2)。其中功能预测类共有 2 430 条注释信息，占比最大 (25.91%)，其次为复制、重组和修复，808 条注释信息 (8.61%)。

2.2.4 Unigene 的 KEGG 代谢途径分析 KEGG 分析显示，共有 6 645 条 Unigenes 被注释，分布于 216 个已知途径中，其中前 12 个代谢途径见表 5，注释基因数占总量的 31.12%。前 5 个途径分别是核糖体 (ko03010) 312 条、溶酶体 (ko04142) 225 条、内质网中的蛋白质加工 (ko04141) 223 条、RNA 转运 (ko03013) 221 条和剪接体 (ko03040) 171 条。

2.3 差异表达基因功能注释及富集分析

低盐胁迫产生 1 492 条差异表达基因，有 829 条显著上调，663 条显著下调。共 810 条差异表达基因得到注释，其中 252 条注释到 GO 数据

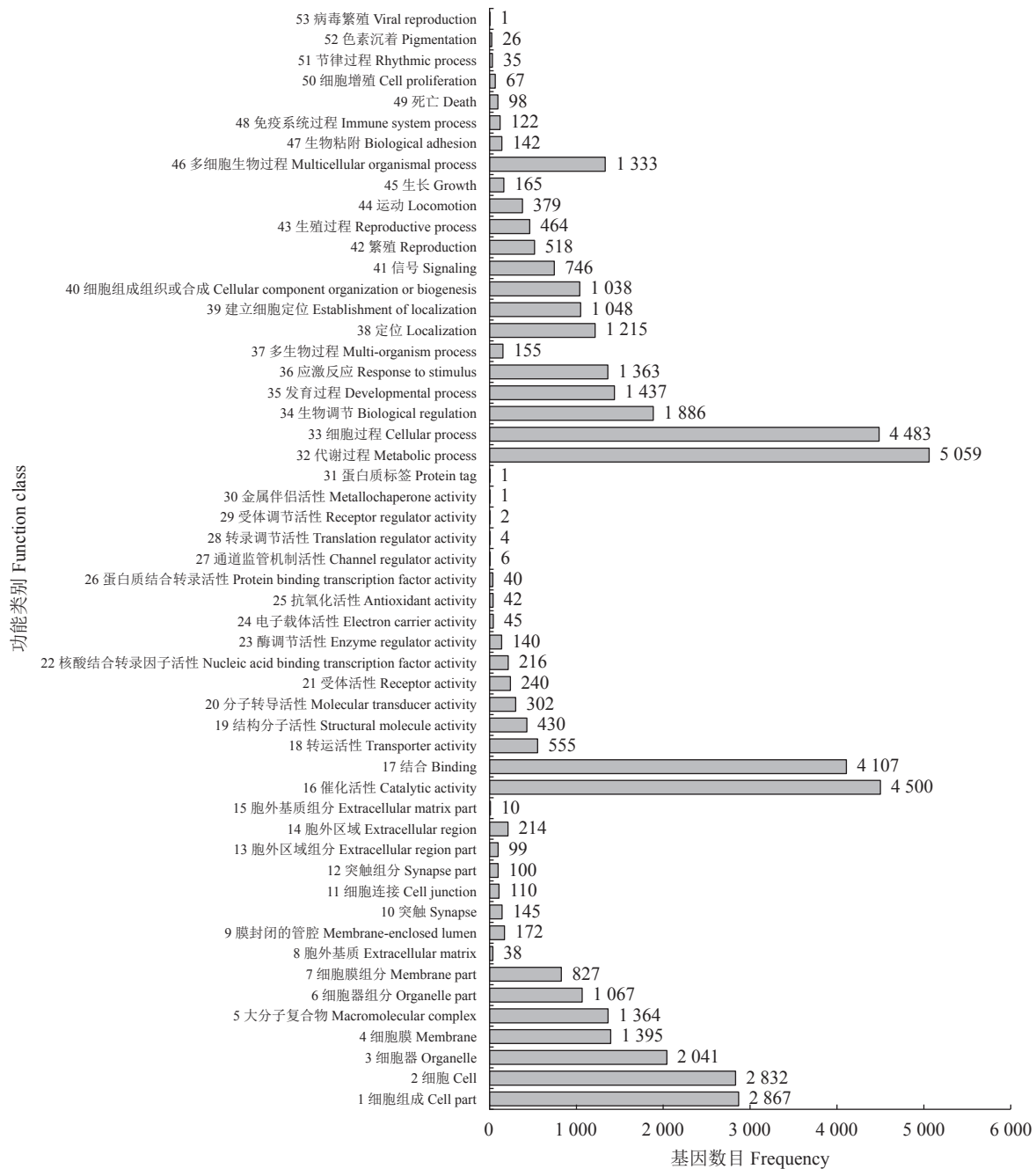


图1 Unigene的GO功能分类

1—15. 细胞组分; 16—31. 分子功能; 32—53. 生物学过程; 图 4 同此

Figure 1 GO classification of Unigene

1—15. Cellular component; 16—31. Molecular function; 32—53. Biological process; the same case in Figure 4.

库, 165 条注释到 KEGG 数据库, 222 条注释到 COG 数据库。

2.3.1 差异表达基因 GO 功能富集 差异表达基因 GO 分类注释图, 其横坐标为三大分类下的二级节点, 纵坐标为该节点中被注释基因的数量和百分比 (图 3)。分析得出, 差异表达基因主要注释到细胞组成、催化活性和代谢过程中。而百分比明显大于所有基因占比的节点为转运活性和色素沉着, 富

集显著性较高, 但色素沉着的注释百分比较低。

利用 topGO 对海水组和低盐胁迫组的差异表达基因进行功能富集, 得到的有向无环图 (分子功能), 可以清晰地显示出各富集节点的层级关系, 分子功能越具体层级越低 (图 4)。最显著的 10 个节点在图中用方框表示。各节点的富集显著性以颜色区分, 由高到低为红色>橘色>黄色。

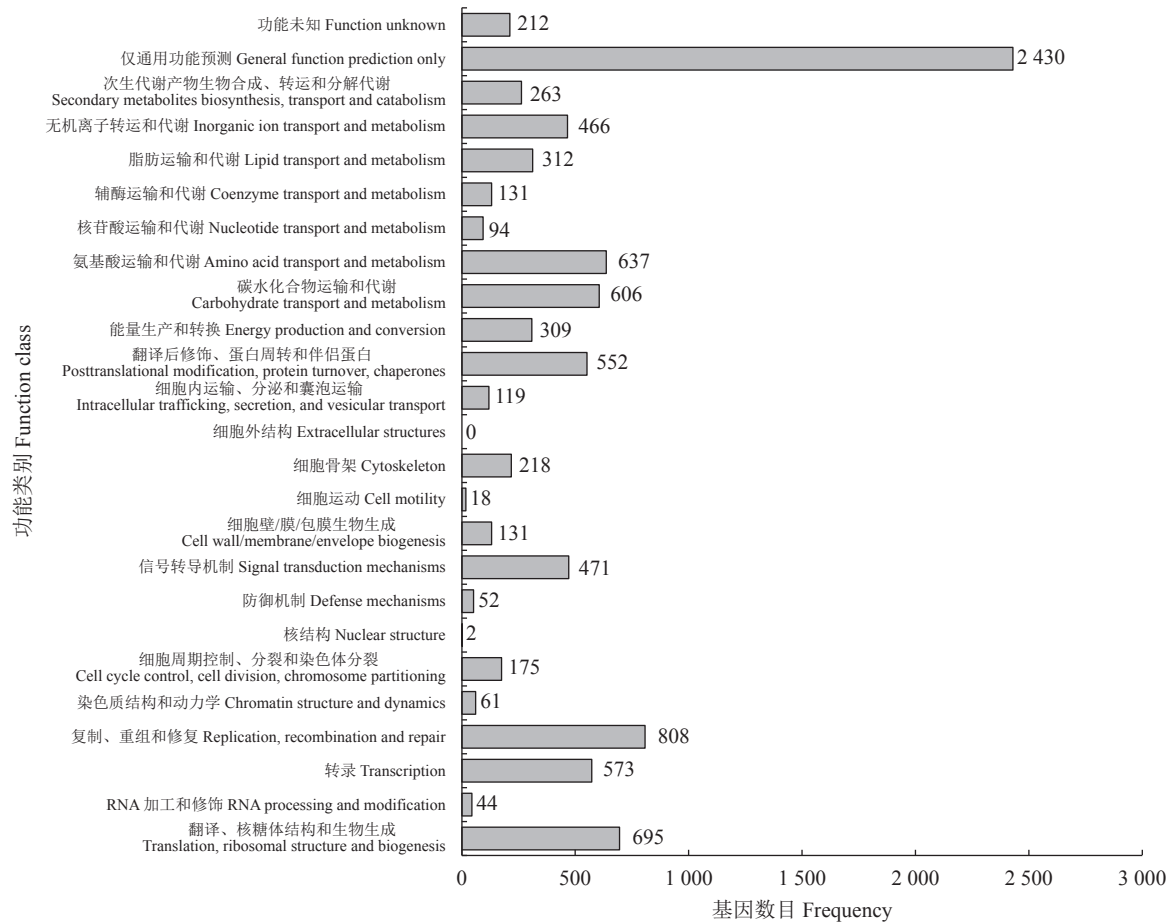


图2 COG功能分类  
Figure 2 COG Function classification of consensus sequence

表5 前12个代谢途径  
Table 5 First 12 metabolic pathways

| 代谢通路<br>Pathway                                           | 代谢通路<br>名称<br>Pathway ID | 基因数量<br>Gene<br>number |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------|------------------------|
| 核糖体 Ribosome                                              | ko03010                  | 312                    |
| 溶酶体 Lysosome                                              | ko04142                  | 225                    |
| 内质网中的蛋白质加工<br>Protein processing in endoplasmic reticulum | ko04141                  | 223                    |
| RNA转运 RNA transport                                       | ko03013                  | 221                    |
| 剪接 Spliceosome                                            | ko03040                  | 171                    |
| 嘌呤代谢 Purine metabolism                                    | ko00230                  | 149                    |
| 泛素-蛋白酶体<br>Ubiquitin mediated proteolysis                 | ko04120                  | 147                    |
| 吞噬体 Phagosome                                             | ko04145                  | 141                    |
| 内吞作用 Endocytosis                                          | ko04144                  | 140                    |
| 氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation                           | ko00190                  | 125                    |
| mRNA监测途径<br>mRNA surveillance pathway                     | ko03015                  | 108                    |
| 过氧化物酶体 Peroxisome                                         | ko04146                  | 106                    |

将最显著的 8 个节点按富集显著性排序，各节点的详细信息见表 6。GO:0003824富集程度最高，该节点中表达量上调幅度最大的 Unigene 为  $\alpha$ -己二酸氨基转移酶， $\log_2FC$  数值为 3.73；下调幅度最大的为磷脂酶， $\log_2FC$  数值为-2.73 (图 4)。

2.3.2 差异表达基因 KEGG 注释 根据 KEGG 数据库注释结果，分析代谢通路中差异基因表达情况，通过通路探索差异的根源。为了识别差异表达基因参与的代谢途径，对差异表达基因 KEGG 的注释结果按照通路类型进行分类，发现注释到溶酶体信号通路的基因最多 (13 条)，其次为赖氨酸降解信号通路 (7 条)，光转导和色氨酸代谢信号通路分别有 5 条 (图 5)。

2.3.3 KEGG 通路富集分析 通路的富集程度由富集因子体现，值越小富集水平越显著；而 Q 值 (多重假设检验校正后的 P 值) 越大富集显著性越可靠。筛选出 20 条差异表达基因显著富集的代谢通路，其中富集程度最显著的 8 个代谢通路是光转导、赖氨酸降解、赖氨酸生物合成、溶酶体、血管

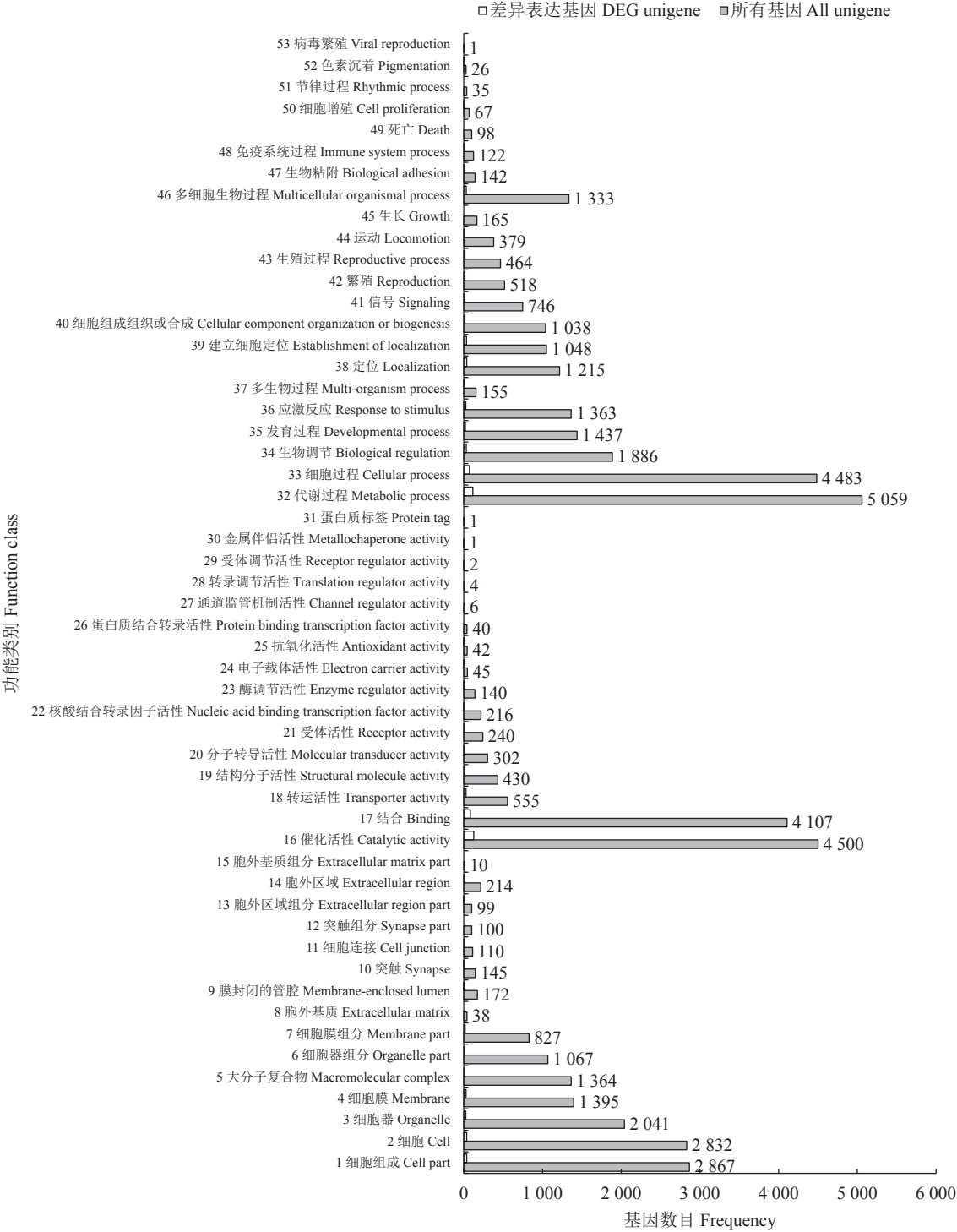


图3 差异表达基因GO分类注释图  
Figure 3 GO classification of differentially expressed genes

内皮生长因子信号途径、叶酸生物合成、色氨酸代谢和血管平滑肌收缩 (表 7)。

对溶酶体信号通路进行展示, 可以看出溶酶体信号通路中的溶酶体酸性水解酶包括蛋白酶、糖苷酶和鞘磷脂酶等 (图 6, 表 8)。低盐胁迫条件下, 组织蛋白酶 L 显著上调,  $\log_2FC$  数值为 2.48, 而

组织蛋白酶 A 和 B 显著下调,  $\log_2FC$  数值分别为 -2.46、-1.28 和 -1.38; 相对而言, 葡萄糖脑苷脂酶、鞘磷脂酶二酯酶和鞘磷脂酶二酯酶 2 均显著下调,  $\log_2FC$  数值分别为 -1.26、-1.89 和 -1.31。溶酶体信号通路主要溶酶体膜蛋白 (Major lysosomal membrane proteins) 中, 溶酶体膜蛋白

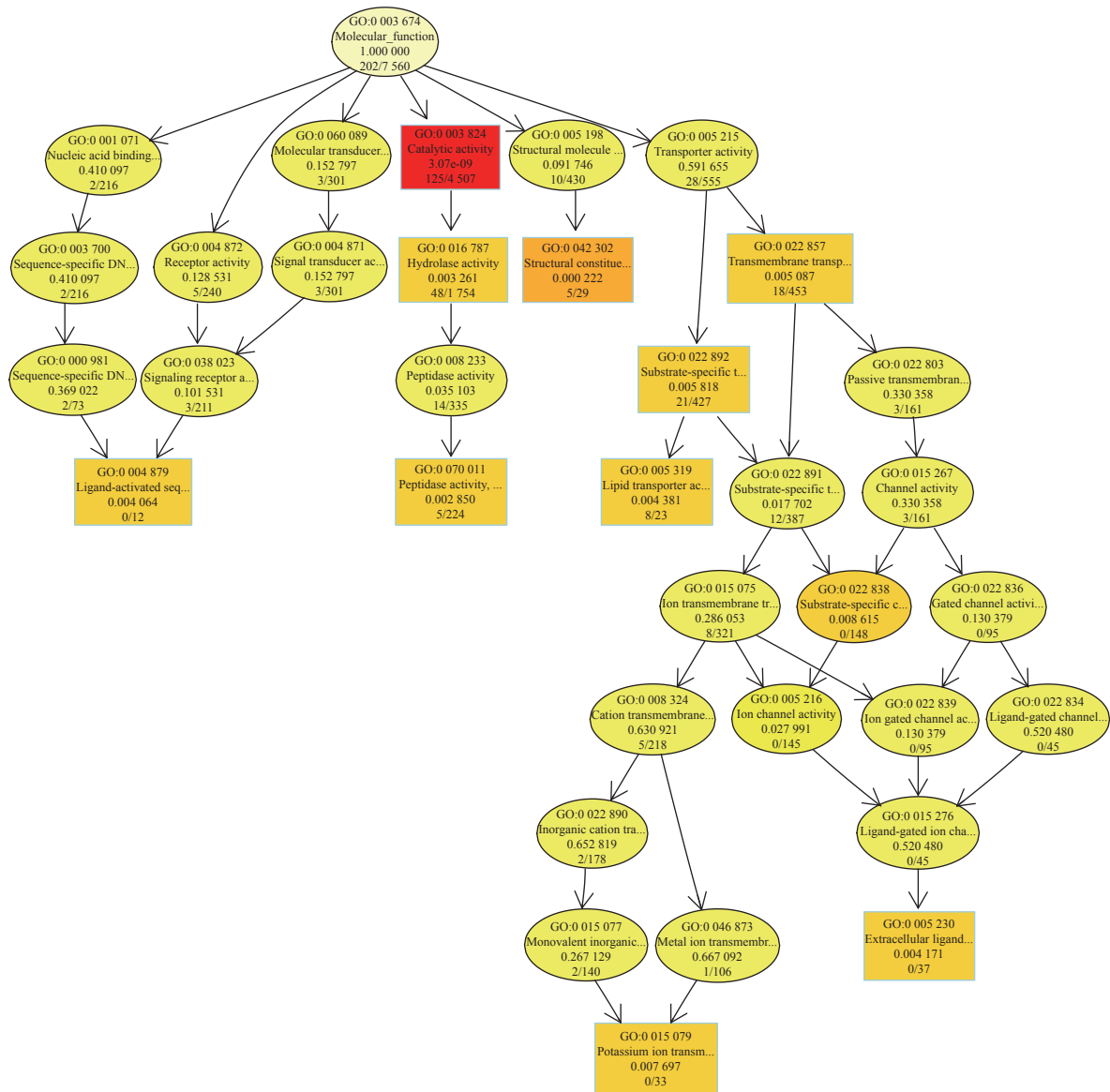


图4 差异表达基因GO富集有向无环图 (分子功能)

Figure 4 Directed acyclic map of GO enrichment of differentially expressed genes (Molecular function)

表6 差异表达基因topGO富集结果示意表 (分子功能)

Table 6 Schematic diagram of topGO enrichment results of differential expression gene (Molecular function)

| 节点编号<br>GO ID | 节点名称<br>GO term                                     | 总基因数<br>Total gene<br>number | DEG基因数<br>DEG gene<br>number | 期望值<br>Expected | 显著性<br>KS          |
|---------------|-----------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|
| GO:0003824    | 催化活性 Catalytic activity                             | 4 507                        | 125                          | 120.43          | $3.1\times10^{-9}$ |
| GO:0042302    | 表皮结构成分 Structural constituent of cuticle            | 29                           | 5                            | 0.77            | 0.000 22           |
| GO:0070011    | 肽酶活性 Peptidase activity                             | 224                          | 5                            | 5.99            | 0.002 85           |
| GO:0016787    | 水解酶活性 Hydrolase activity                            | 1 754                        | 48                           | 46.87           | 0.003 26           |
| GO:0004879    | 配体激活序列特异性 DNALigand-activated sequence-specific DNA | 12                           | 0                            | 0.32            | 0.004 06           |
| GO:0005230    | 细胞外配体门控离子通道 Extracellular ligand-gated ion channel  | 37                           | 0                            | 0.99            | 0.004 17           |
| GO:0005319    | 脂质转运蛋白活性 Lipid transporter activity                 | 23                           | 8                            | 0.61            | 0.004 38           |
| GO:0022857    | 跨膜转运蛋白活性 Transmembrane transporter activity         | 453                          | 18                           | 12.1            | 0.005 09           |

注：DEG 指差异表达基因

Note: DEG is differentially expressed gene.

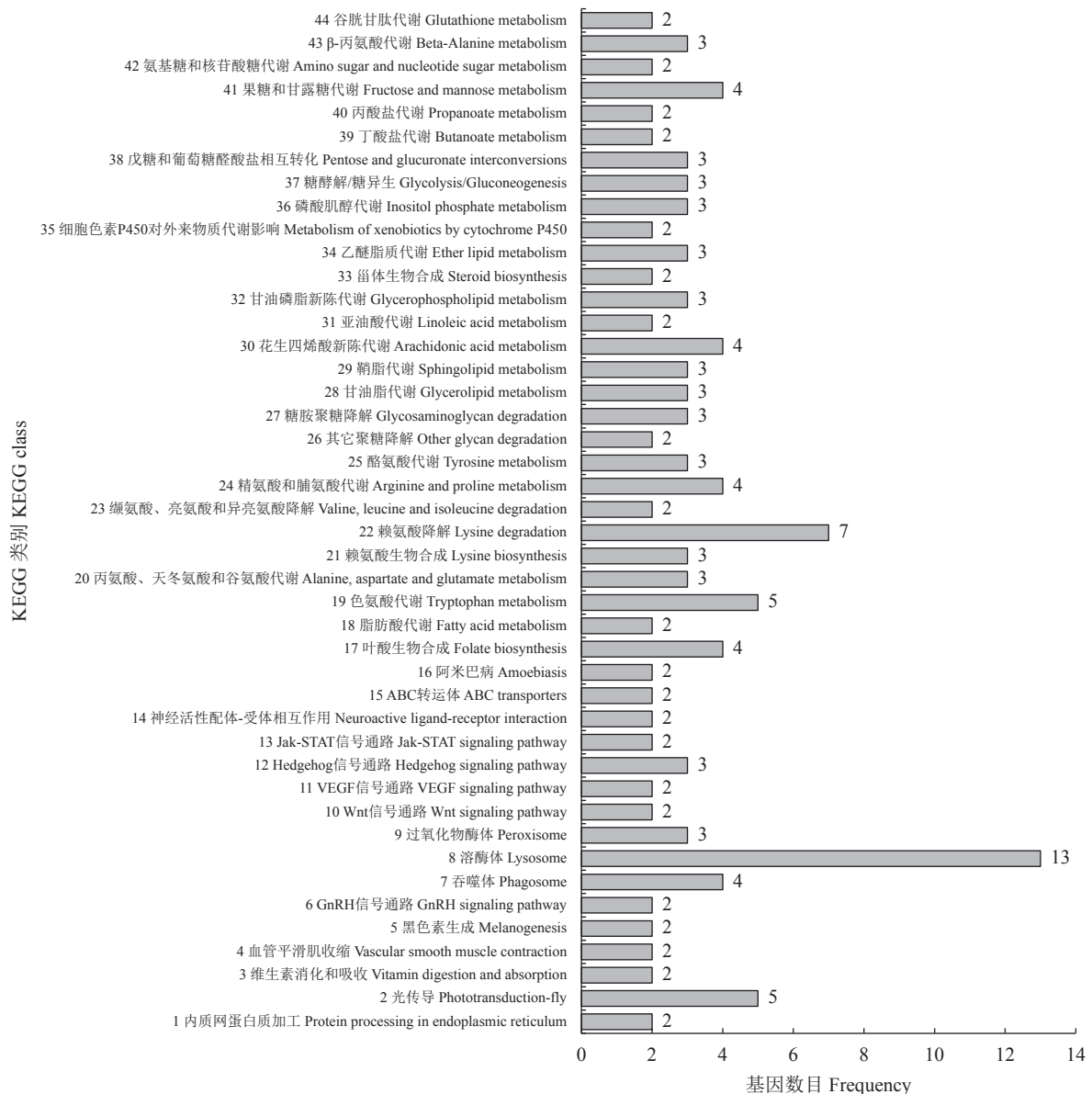


图5 差异表达基因KEGG分类图

1. 遗传信息处理; 2—6. 有机系统; 7—9. 细胞过程; 10—15. 环境信息处理; 16. 人类疾病; 17—44. 代谢

Figure 5 KEGG classification of differential expression gene

1. Genetic information processing; 2—6. Organismal systems; 7—9. Cellular processes; 10—15. Environmental information processing; 16. Human diseases; 17—44. Metabolism

2 在低盐胁迫条件下显著下调,  $\log_2FC$  数值为  $-1.64$ ; 次要溶酶体膜蛋白 (Minor lysosomal membrane proteins) 中, NPC 细胞内胆固醇转运体 1 和 2 在低盐胁迫条件下均下调,  $\log_2FC$  数值分别为  $-1.16$  和  $-2.11$ , 而钠/唾液酸共转体为混合调节,  $\log_2FC$  数值分别为  $3.02$ 、 $1.35$  和  $-2.01$ 。

## 2.4 差异表达基因的验证

运用 RT-PCR 测得差异表达基因在脊尾白虾不同部位 (鳃、肝胰腺和肌肉) 中的表达量, 并得到差异倍数对数值 ( $\log_2FC$ ) 随时间的变化。图 7 参考

值为转录组测序数据中该差异表达基因, 根据  $\log_2$  转换后的差异倍数对数值 ( $\log_2FC$ ), 详细信息见表 9。生殖蛋白 A 基因在肝胰腺中表达量显著升高, 第 6 小时  $\log_2FC$  为  $4.23$ , 与转录组分析结果较为一致; 但在鳃和肌肉中表达下调 (图 7-A)。ETS 转录因子 4 基因表达量在鳃中呈先下降再上升的趋势, 第 4、第 6 小时  $\log_2FC$  约为  $2.58$ , 与转录组分析结果较为一致, 而在肝胰腺和肌肉中呈波动变化 (图 7-B)。钠/唾液酸共转体基因在鳃、肝胰腺和肌肉中差异表达均不显著 (图 7-C)。胰蛋白酶

表7 KEGG富集部分结果  
Table 7 Partial results of KEGG enrichment

| 代谢通路<br>Metabolic pathway                  | KEGG通路编号<br>KO pathway No. | 富集因子<br>Enrichment factor | Q                      |
|--------------------------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|
| 光转导 Phototransduction-fly                  | ko04745                    | 0.13                      | $3.412 \times 10^{-2}$ |
| 赖氨酸降解 Lysine degradation                   | ko00310                    | 0.24                      | $1.095 \times 10^{-1}$ |
| 赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis                | ko00300                    | 0.10                      | $2.608 \times 10^{-1}$ |
| 溶酶体 Lysosome                               | ko04142                    | 0.43                      | $2.947 \times 10^{-1}$ |
| 血管内皮生长因子信号途径 VEGF signaling pathway        | ko04370                    | 0.05                      | $3.363 \times 10^{-1}$ |
| 叶酸生物合成 Folate biosynthesis                 | ko00790                    | 0.18                      | $5.565 \times 10^{-1}$ |
| 色氨酸代谢 Tryptophan metabolism                | ko00380                    | 0.24                      | $5.799 \times 10^{-1}$ |
| 血管平滑肌收缩 Vascular smooth muscle contraction | ko04270                    | 0.07                      | $8.143 \times 10^{-1}$ |

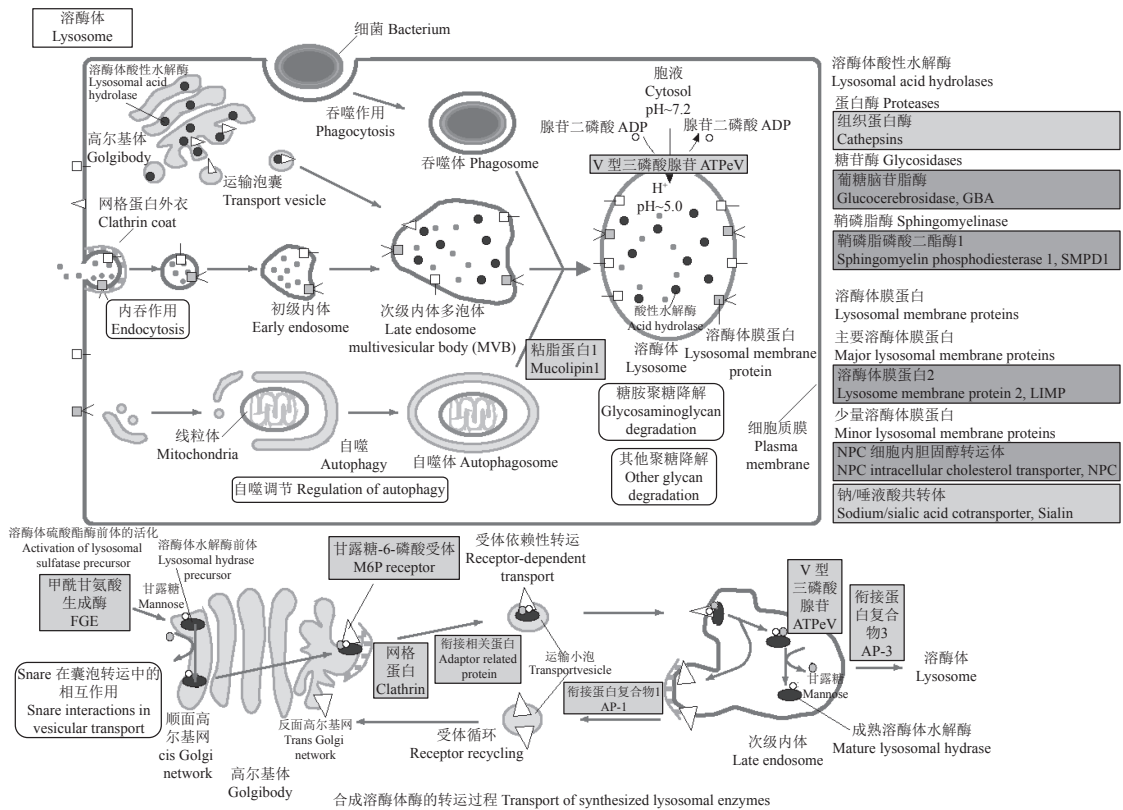


图6 溶酶体信号通路

Figure 6 Lysosomal signaling pathway

基因在鳃和肌肉中表达下调，与转录组分析结果较为一致；但在肝胰腺中表达上调，呈先升后降的趋势(图 7-D)。Smads 蛋白 4 基因在鳃和肌肉中表达下调，与转录组分析结果较为一致，而在肝胰腺中呈波动变化(图 7-E)。钙结合蛋白基因表达量在鳃、肝胰腺和肌肉 3 个检测组织下调幅度均较转录组分析结果大(图 7-F)。α-葡萄糖苷酶基因在鳃中表达上调，而在肝胰腺和肌肉中表达下调

(图 7-G)。

3 讨论

高通量转录组测序技术在水产养殖中已得到广泛应用，刘九美<sup>[28]</sup>研究开发出脊尾白虾多态性微卫星位点及 SNP 位点，以揭示其回交家系的优良性状。通过转录组测序及后续分析，利用 RACE 技术可克隆得出脊尾白虾全长基因<sup>[29-30]</sup>。王传聪

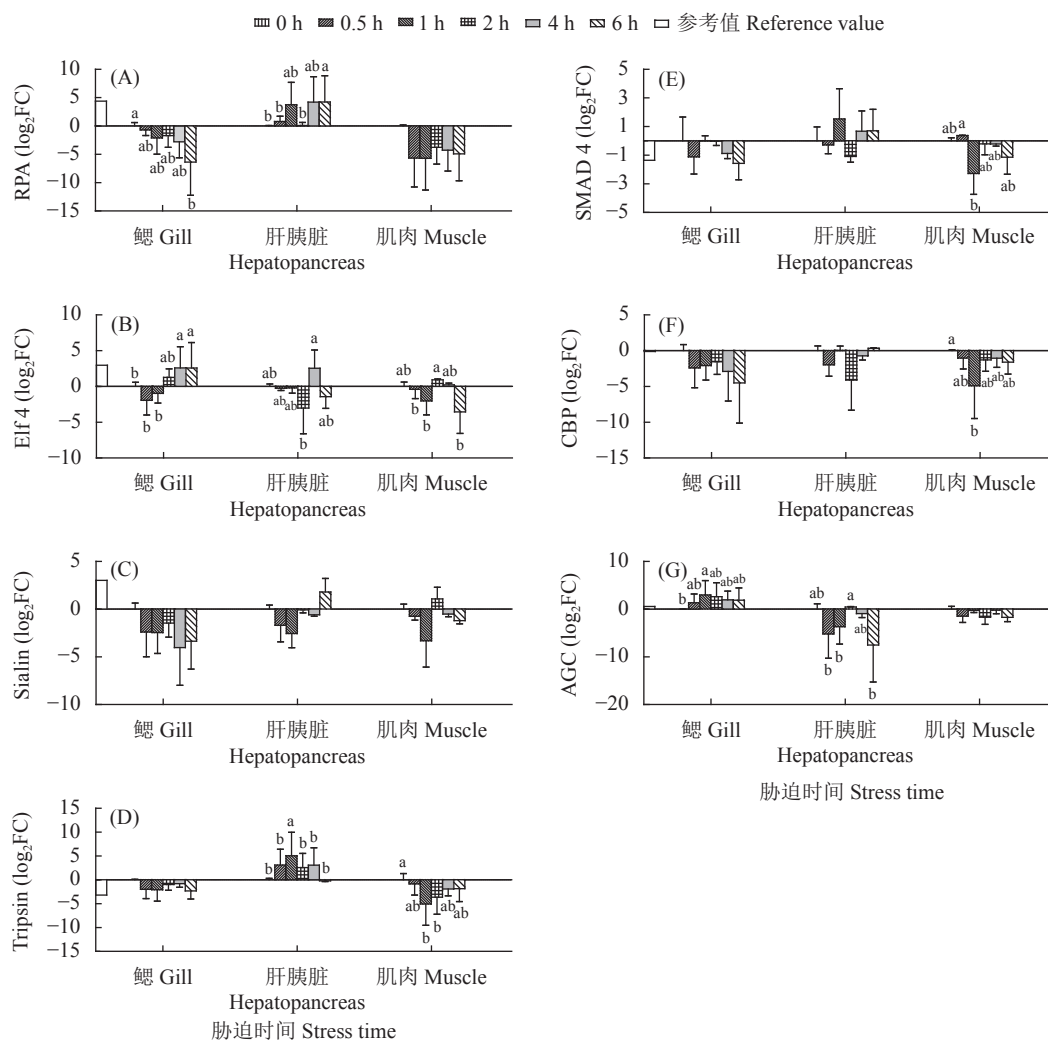
表8 溶酶体信号通路包含Unigenes序列信息  
Table 8 Lysosome signaling pathway containing Unigenes sequence information

| 基因描述<br>Gene description                                          | 海水组FPKM值<br>FPKM in seawater<br>group | 低盐胁迫组FPKM值<br>FPKM in low salinity<br>stress group | 差异倍数对数值<br>log <sub>2</sub> FC | 上调/下调<br>Up/Down |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| 钠/唾液酸共转运体<br>Sodium/sialic acid cotransporter, Sialin             | 0.72                                  | 6.87                                               | 3.02                           | 上调               |
| 钠/唾液酸共转运体<br>Sodium/sialic acid cotransporter, Sialin             | 3.70                                  | 10.83                                              | 1.35                           | 上调               |
| 钠/唾液酸共转运体<br>Sodium/sialic acid cotransporter, Sialin             | 4.10                                  | 1.14                                               | -2.01                          | 下调               |
| 组织蛋白酶A Cathepsin A                                                | 0.23                                  | 1.63                                               | -2.46                          | 下调               |
| 组织蛋白酶B Cathepsin B                                                | 0.92                                  | 0.16                                               | -1.28                          | 下调               |
| 组织蛋白酶B Cathepsin B                                                | 66.66                                 | 31.23                                              | -1.38                          | 下调               |
| 组织蛋白酶L Cathepsin L                                                | 60.39                                 | 26.51                                              | 2.48                           | 上调               |
| 鞘磷脂磷酸二酯酶<br>Sphingomyelin phosphodiesterase, SMPD1                | 5.50                                  | 1.67                                               | -1.89                          | 下调               |
| 鞘磷脂磷酸二酯酶2<br>Sphingomyelin phosphodiesterase 2, SMPD1             | 16.44                                 | 7.57                                               | -1.31                          | 下调               |
| NPC细胞内胆固醇转运体1<br>NPC intracellular cholesterol transporter 1, NPC | 147.00                                | 38.91                                              | -1.16                          | 下调               |
| NPC细胞内胆固醇转运体2<br>NPC intracellular cholesterol transporter 2, NPC | 26.45                                 | 13.48                                              | -2.11                          | 下调               |
| 溶酶体膜蛋白2<br>Lysosome membrane protein 2, LIMP                      | 1.70                                  | 0.60                                               | -1.64                          | 下调               |
| 葡萄糖脑苷脂酶<br>Glucocerebrosidase, GBA                                | 14.69                                 | 6.97                                               | -1.26                          | 下调               |

等<sup>[31]</sup> 进行罗氏沼虾肝胰腺组织转录组测序，获得 33 450 条 Unigenes。孙健<sup>[32]</sup> 用 Illumina Hiseq 4000 测序平台，对氨氮胁迫后日本沼虾 (*M. nipponense*) 的肝胰腺进行转录组测序，共获得 75 742 条转录本，63 453 条 Unigenes，注释率 100%。陈雪峰等<sup>[33]</sup> 采用 Illumina HiSeqTM4000 高通量测序平台，对罗氏沼虾卵巢发育 4 个时期的卵巢组织进行转录组测序，共获得 95 379 条 Unigenes，注释率 54.55%。董丽君等<sup>[34]</sup> 进行凡纳滨对虾肝胰腺组织 Illumina HiSeq 2500 测序，筛选低温胁迫下的差异表达基因，共获得 50 921 条 Unigenes，平均长度为 828 bp，N50 为 1 589 bp，其中 37.28% 得到注释。本研究运用 Illumina HiSeq2500 测序平台，对脊尾白虾进行转录组测序，共获得 13.92 Gb 高质量数据，海水组与低盐胁迫组样品共获得 72 734 条 Unigenes，平均长度为 951.16 bp，N50 为 1 502 bp，其中 22 879 条得到注释，占 31.45%。

注释率较低，可能是由于相近物种的基因注释信息在数据库中收录较少，且脊尾白虾自身转录组测序研究较少。

陈科<sup>[35]</sup> 对凡纳滨对虾低盐度胁迫转录组 jin'x 测序，发现最显著变化的 GO 通路为催化活性、组蛋白 H4 乙酰化和表皮结构成分等；显著变化的 KEGG 通路有鞘糖脂生物合成、赖氨酸降解和糖胺聚糖生物合成信号通路等。本研究通过差异表达基因 GO 功能富集分析，发现低盐胁迫对脊尾白虾催化活性、表皮结构成分、肽酶活性、水解酶活性、配体激活序列特异性、脂质转运蛋白活性、跨膜转运蛋白活性等影响显著。KEGG 通路富集分析结果显示，主要富集到的 8 个代谢通路，分别为光转导、赖氨酸降解、赖氨酸生物合成、溶酶体、血管内皮生长因子信号通路、叶酸生物合成、色氨酸代谢、血管平滑肌收缩，其中注释到溶酶体信号通路的差异表达基因最多。

图7 低盐胁迫对脊尾白虾log<sub>2</sub>FC的影响log<sub>2</sub>FC. 差异倍数对数值Figure 7 Effects of low salinity stress on log<sub>2</sub>FC of *E. carinicauda*log<sub>2</sub>FC. The pair value of fold change

溶酶体是细胞内具有降解、胞外分泌和信号传递功能的一类细胞器，包括溶酶体外膜和溶酶体内腔<sup>[36]</sup>。细胞受到胁迫时激活自噬功能，可通过溶酶体降解来达到代谢平衡<sup>[37]</sup>。溶酶体中含有很多蛋白，半胱氨酸蛋白酶是其中含量较多的一种组织蛋白酶，可降解并消化溶酶体内腔中的生物大分子<sup>[36]</sup>。神经酰胺是细胞凋亡的第二信使，而葡萄糖神经酰胺合成酶催化其糖基化，使之无细胞毒性，促进鞘糖脂合成<sup>[38]</sup>。对溶酶体信号通路挖掘发现，低盐度胁迫条件下，注释到该信号通路的 13 个差异表达基因中，钠/唾液酸共转体为混合调节，组织蛋白酶 L 显著上调，而其他基因均显著下调，推测低盐度胁迫影响了溶酶体对胆固醇的清除和转运，可能通过调控神经酰胺相关酶的活性，影响细胞的生

长和信号传导，并在一定程度上影响了溶酶体的降解功能。

ETS 转录调控因子家族参与调节造血细胞、神经细胞和血管内皮细胞等的分化，ETS 转录因子 4 是 ETS 家族重要成员，参与细胞多种生理或病理过程<sup>[39-41]</sup>。Smads 蛋白 4 是 SMADs 家族中公共介体性 SMAD (Common mediator SMAD) 的一种，具有保持 SMAD 复合物转录活性的作用，参与转化生长因子  $\beta$  的细胞内信号转导，与组织纤维化有一定关系<sup>[42-43]</sup>。钙结合蛋白能与钙离子形成复合物，维护细胞内的钙稳态；钙离子通过钙结合蛋白在生物体内发挥作用，是肌肉纤维运动的主要调控信号，影响肌肉纤维的收缩性能<sup>[44]</sup>。胰蛋白酶是一种丝氨酸蛋白酶，它不仅起到消化酶的作用，还起到

表9 验证的Unigenes序列信息  
Table 9 Sequence information of verified unigenes

| 基因描述<br>Gene description                                   | 海水组FPKM值<br>FPKM in<br>seawater group | 低盐胁迫组FPKM值<br>FPKM in low salinity stress<br>group | 差异倍数对数值<br>log <sub>2</sub> FC | 上调/下调<br>Up/Down |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------|------------------|
| 生殖蛋白A Reproductive-related protein A, RPA                  | 8.01                                  | 190.85                                             | 4.37                           | 上调               |
| ETS转录因子4 ETS-related transcription factor 4, Elf 4         | 0.45                                  | 4.34                                               | 2.97                           | 上调               |
| 钠/唾液酸共转体 Sodium/sialic acid cotransporter, Sialin          | 0.72                                  | 6.87                                               | 3.02                           | 上调               |
| 胰蛋白酶 Tripsin                                               | 8.07                                  | 0.88                                               | -3.20                          | 下调               |
| Smads蛋白4 Mothers against decapentaplegic protein 4, SMAD 4 | 1.589                                 | 0.56                                               | -1.36                          | 下调               |
| 钙结合蛋白 Calcium-binding protein, CBP                         | 0.502                                 | 0.451                                              | -0.13                          | 下调               |
| α-葡糖苷酶 Alpha-glucosidase, AGC                              | 3.538                                 | 5.228                                              | 0.55                           | 上调               |

活化作用，激活其他蛋白酶类，对胶原纤维结构有一定破坏作用，可能参与了海参自溶<sup>[45-46]</sup>。正常情况下胰蛋白酶活性被适当抑制，少量胰蛋白酶原转化为活性胰蛋白酶，被胰蛋白酶抑制剂灭活，防止细胞受损。胰蛋白酶的激活超过胰蛋白酶抑制剂的能力，会导致损伤细胞的各种蛋白酶的激活，这是胰腺炎发病的主要原因<sup>[47]</sup>。α-葡糖苷酶参与淀粉等糖原的代谢，具有水解和转糖苷的双重作用，抑制其活性可减缓葡萄糖的生成，同时调节体内的脂肪水平<sup>[48]</sup>。本研究转录组数据分析发现，低盐胁迫显著提高 α-葡糖苷酶和 ETS 转录因子 4 基因的表达，而 Smads 蛋白 4、钙结合蛋白和胰蛋白酶表达显著降低，推测脊尾白虾可能通过促进 ETS 转录因子 4 产生，提高 α-葡糖苷酶活性以维持机体的正常生理功能，抑制胰蛋白酶活性以维持脊尾白虾低盐应激反应的稳态；而钙结合蛋白的表达下调表明低盐胁迫影响了脊尾白虾肌肉的纤维收缩能力。实时定量 PCR 结果显示，基因在鳃、肝胰腺和肌肉中的表达情况不尽相同，并且随时间变化，基因的表达量也有所波动，可能与转录组测序的时间点只有一个临界时间点，而且是全虾整体混合测序，而实时定量验证所用模板为脊尾白虾的各个组织，且覆盖了低盐胁迫过程中的各个阶段有关。

然而，图 7 验证试验中生殖蛋白 A、ETS 转录因子 4、钠/唾液酸共转体、胰蛋白酶、Smads 蛋白 4、钙结合蛋白和 α-葡糖苷酶等 7 条差异表达基因偏差较大，可能有 2 个原因：1) 脊尾白虾低盐胁迫实验结果可能受采样操作过程和自身盐度耐受差异等因素的影响，造成一定偏差；2) 可能与使用的分析软件有关，本文所用的分析软件优点是通

过输入 RT-PCR 测定数值，可以直接算出 log<sub>2</sub> 转换后的差异倍数对数值 (log<sub>2</sub>FC)，基因上调和下调趋势一目了然，弥补了先前使用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法对下调基因展示的不足，但也带来了标准偏差较大的问题。

本研究挖掘了脊尾白虾低盐环境下的相关信号通路及差异表达基因数据，为脊尾白虾分子生物学研究提供了丰富的基因资源，也可为今后进行脊尾白虾低盐胁迫生理机制的探讨和关键差异表达基因的深入挖掘提供技术支撑。

参考文献：

[1] ZHAO Z Y, YIN Z X, WENG S P, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 22(5): 520-534.

[2] 李新堂, 陈建芳, 张永杰, 等. 低盐度养殖脊尾白虾试验 [J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(3): 24-25.

[3] 孙益奎. 盐田效益池秋冬季养殖脊尾白虾的探讨 [J]. 苏盐科技, 2002(4): 12-13.

[4] 殷为, 隋丽英. 盐度对凡纳滨对虾、中国明对虾和斑节对虾仔虾生长和存活的影响 [J]. 天津科技大学学报, 2012, 27(1): 23-26.

[5] 李庭古. 盐度对克氏原螯虾的存活、生长、代谢及受精卵孵化的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007: 41-43.

[6] 何竺柳. 低盐度胁迫对罗氏沼虾生长和肉质的影响 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2018: 46-48.

[7] 张涛, 史会来, 平洪领, 等. 盐度和漂白粉对东方新糠虾的急性胁迫影响 [J]. 水产养殖, 2019, 40(1): 18-22.

[8] 鲁耀鹏, 钱坤, 汪蕾, 等. 养殖盐度对凡纳滨对虾抗氧化酶及免疫相关酶活力的影响 [J]. 河北渔业, 2019(12): 1-5.

[9] 张龙岗, 董学颀, 朱永安, 等. 急性盐度胁迫对克氏原螯虾肝脏抗氧化酶及鳃丝 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活力的影响 [J]. 淡水渔业,

- 2015, 45(4): 87-91.
- [10] 张敏. 盐度胁迫下南美白对虾雌虾卵巢和肝胰腺中基因表达的响应 [C]//浙江省水产学会. 第十二届浙江渔业科技论坛论文摘要集. 湖州: 浙江省科学技术协会, 2017: 29-30.
  - [11] 秦玉凯. 斑节对虾 C 型凝集素抗菌作用及其在氨氮和盐度胁迫下表达模式的相关研究 [C]//中国水产学会. 2018 年中国水产学会学术年会论文摘要集. 西安: 中国水产学会, 2018: 39.
  - [12] 李洋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾酚氧化酶原基因克隆及表达分析 [J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 299-306.
  - [13] 李洋, 刘萍, 李健, 等. 脊尾白虾丝氨酸蛋白酶抑制剂基因克隆及表达分析 [J]. 中国水产科学, 2013, 20(6): 1166-1174.
  - [14] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(7): 644-652.
  - [15] SIMS D, SUDBERY I, ILOTT N E, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses[J]. Nat Rev Genet, 2014, 15(2): 121-132.
  - [16] van-DIJK E L, AUGER H, JASZCZYSZYN Y, et al. Ten years of next-generation sequencing technology[J]. Trends Genet, 2014, 30(9): 418-426.
  - [17] 王一泽. 饲料中添加抗生素对半滑舌鳎肠道酶组织化学、肠道转录组及菌群结构的影响 [D]. 天津: 天津农学院, 2017: 75-87.
  - [18] KLEPPE L, EDVARDSEN R B, FURMANEK T, et al. Global transcriptome analysis identifies regulated transcripts and pathways activated during oogenesis and early embryogenesis in Atlantic cod[J]. Mol Reprod Dev, 2014, 81(7): 619-635.
  - [19] MENG X, TIAN X, LIU M, et al. The transcriptomic response to copper exposure by the gill tissue of Japanese scallops (*Mizuhopecten yessoensis*) using deep-sequencing technology[J]. Fish Shellfish Immunol, 2014, 38(2): 287-293.
  - [20] 龚诗琦. 黄姑鱼微卫星标记的开发与应用 [D]. 厦门: 集美大学, 2016: 43-55.
  - [21] 罗志嘉, 李潇, 曾丹, 等. 角鲨 RNA-seq 转录组分析及生长相关基因筛选 [J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(4): 1480-1487.
  - [22] 王日芳. 脊尾白虾近交系遗传多样性的微卫星分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 41-60.
  - [23] 孙政. 脊尾白虾转录组分析及重要功能基因的发掘 [C]//中国海洋湖沼学会, 中国科学院海洋研究所. 中国海洋湖沼学会第十次全国会员代表大会暨学术研讨会论文集. 青岛: 中国海洋湖沼学会, 2012: 1.
  - [24] 冯宁宁. 虾类 *IMD* 基因的功能分析及抗病指标的筛选 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2013: 64-72.
  - [25] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12(1): 1-16.
  - [26] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. Bioinformatics, 2010, 26(1): 139-140.
  - [27] TANG H B, WANG X Y, BOWERS J E, et al. Unraveling ancient hexaploidy through multiply-aligned angiosperm gene maps[J]. Genome Res, 2008, 18(12): 1944-1954.
  - [28] 刘九美. 脊尾白虾回交家系的遗传特性及免疫功能研究 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2017: 42-58.
  - [29] 连春盎. 干露胁迫对脊尾白虾呼吸代谢相关酶和低氧诱导因子的影响 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2016: 20-41.
  - [30] 王婧. 脊尾白虾几丁质酶的分离、特征及功能分析 [D]. 青岛: 中国科学院研究生院 (海洋研究所), 2015: 45-66.
  - [31] 王传聪, 唐修阳, 项杰, 等. 罗氏沼虾转录组 SSR 标记信息分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(22): 56-59.
  - [32] 孙健. 日本沼虾抗氨氮胁迫转录组与代谢组分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2017: 36-54.
  - [33] 陈雪峰, 王春琳, 顾志敏, 等. 罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 卵巢发育不同时期转录组分析 [J]. 海洋与湖沼, 2019, 50(2): 398-408.
  - [34] 董丽君, 孟宪红, 孔杰, 等. 基于转录组分析筛选凡纳滨对虾低温胁迫下的差异表达基因 [J]. 中国水产科学, 2019, 26(1): 161-171.
  - [35] 陈科. 低盐度下凡纳滨对虾脂肪营养生理研究 [D]. 上海: 华东师范大学, 2017: 25-26.
  - [36] 徐猛. 溶酶体生成的调控机制及降解功能研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2016: 15-18.
  - [37] 邹辉, 孙建, 于凡, 等. 镉暴露对 BRL 3A 细胞溶酶体的影响 [J]. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1602-1608.
  - [38] 胡萍萍, 田波, 陈同钰. 葡萄糖神经酰胺合成酶与肿瘤多药耐药 [J]. 医学分子生物学杂志, 2007, 4(2): 181-184.
  - [39] 曾红, 杨洋, 安瑜, 等. Ets 转录因子的生理作用研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(12): 1645-1650.
  - [40] LIU M, GAO W, van-VELKINBURGH J C, et al. Role of Ets proteins in development, differentiation, and function of T-cell subsets[J]. Med Res Rev, 2016, 36(2): 193-220.
  - [41] 王瑾, 唐青海, 谷雅静, 等. 猪 *ELF4* 基因的克隆、蛋白表达及其多克隆抗体制备 [J]. 畜牧兽医学报, 2017, 48(3): 425-435.
  - [42] 孙琰, 叶棋浓. *Smad4* 蛋白的研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2005, 16(3): 299-302.
  - [43] 于洋, 史嘉翊, 黄珍, 等. 肝纤维化中 *TGF-β/Smad* 信号通路研究进展 [J]. 牡丹江医学院学报, 2019, 40(5): 121-123.
  - [44] 农小献, 宾石玉, 蒙涛, 等. 小清蛋白研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2011, 22(6): 887-891.
  - [45] 李小鹏, 王卿惠, 王世伟, 等. 动物 Trypsin 基因结构、表达及应用研究进展 [J]. 高师理科学刊, 2017, 37(10): 41-47.
  - [46] 妥丰艳. 胰蛋白酶对刺参体壁胶原超分子结构的降解作用研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2016: 28-51.
  - [47] HIROTA M, OHMURAYA M, BABA H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis[J]. J Gastroenterol, 2006, 41(9): 832-836.
  - [48] 陈天晴. 膳食多酚抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的构效关系研究 [D]. 上海: 上海师范大学, 2018: 6-9.