

RNA-seq揭秘澳洲鳗鱼卵黄蛋白原摄取的重要影响因素

基于华大智造DNBSEQ平台的RNA-Seq技术表明细胞连接对卵黄原蛋白摄取有调节作用

新西兰奥塔哥大学动物学系为了研究细胞连接蛋白在调节卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)摄取中的作用, 基于华大智造DNBSEQ测序平台完成了鳗鱼(*A. australis*)卵巢组织的RNA-Seq测序工作, 通过比较卵黄发生前 (PV) 和早期卵黄发生期 (EV) 卵巢的转录组, 发现基因表达模式可能有助于识别参与调节 Vtg 摄取的合适基因, 并为*A. australis*提供了新的测序数据。相关成果已于2022年发表于Cells杂志, 题为“Are Cell Junctions Implicated in the Regulation of Vitellogenin Uptake? Insights from an RNAseq-Based Study in Eel, *Anguilla australis*”¹。

推荐应用: 海洋组学

推荐机型: MGISEQ-2000RS

• 完整的RNA-Seq组合产品

MGIEasy RNA方向性文库制备试剂盒可搭配华大智造自动化系统、DNBSEQ测序平台和生信分析软件;全方位赋能RNA-Seq研究。

• 测序数据产出高效且质量高

DNBSEQ测序技术具有高准确性, 低重复序列率以及低标签跳跃等重要特性。

• 获得与调节Vtg 摄取有关的新基因信息

鳗鱼(*Anguilla anguilla*)的从头卵巢转录组组装和基于 RNA-seq对卵黄发生前期(PV)和卵黄发生期(EV)卵巢的研究, 获得了可能参与 Vtg 摄取调节的新基因信息。



背景介绍

卵生动物的胚胎在亲本体外独立发育和成熟，所以高质量的卵子是卵生动物维持后代发育所必需的²。卵生动物的卵巢发育包括卵原细胞期、卵黄发生前期(PV)和卵黄发生期(EV)三个阶段^{3,4}。卵黄发生是卵母细胞发育所必需的，它通过摄取大量的卵黄蛋白原(Vitellogenin,Vtg)-卵黄蛋白的前体物质，使卵黄蛋白(vitellin, Vn)在卵母细胞中快速积累，这将为随后的胚胎发育提供能量储备和丰富的营养物质⁴。

鳗鱼(*Anguilla anguilla*)是一种硬骨鱼，具有独特的生命周期，是研究生殖生理调节机制的理想模型⁵。在鱼类中，Vtg主要在肝脏中雌激素的诱导下合成，并通过血液运输到卵巢处，由Vtg受体(VTGR)介导Vtg进入卵母细胞中，并且VTGR是影响Vtg摄取的独特因素，卵泡内发生的不同分子事件也会影响Vtg的摄取。因此，提出机械屏障和化学屏障假设，以探究细胞连接是否与Vtg摄取的调节有关。

研究描述

新西兰奥塔哥大学动物学系基于华大智造的DNBSEQ测序平台，采用MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装(16RXN)构建了澳洲鳗鱼卵巢组织的总RNA文库并进行高通量测序。通过RNA-seq比较野生鳗鱼卵黄发生前期(PV)和卵黄发生期(EV)卵巢组织的转录组信息，发现编码颗粒细胞层内的紧密连接(TJ)构成蛋白的25个基因中，5个下调、2个上调，这部分支持了机械屏障假说；并且也发现内吞途径在 PV-EV 过渡期间被上调。因此，最终该研究表明了基因表达模式可能有助于识别参与调节 Vtg 摄取的合适基因，并为 *A. australis* 提供了新的序列数据，包括与低密度脂蛋白受体家族的 Lr8 和 Lrp13 成员相对应的推定Vtg受体。

实验方法

样本收集及RNA提取

该团队从埃尔斯米尔湖(新西兰南岛；2019年)捕获野生短鳍鳗。根据形态特征辨别PV和EV鳗鱼，测量总体重、解剖后称量卵巢和肝脏以计算体细胞指数：性腺体指数(GSI)和肝体指数(HSI)。将卵巢片段固定在4%多聚甲醛中用于组织学分析，并快速冷冻用于RNA提取和二代测序。

样本收集及RNA提取

按照NucleoSpin RNA试剂盒说明书提取卵巢总RNA后测量总RNA浓度并测定相对纯度水平，其260/280 nm吸光度比约为2；使用Agilent 5300片段分析仪进一步检测RNA的质量和完整性，获得RNA完整性数(RIN)：7.1±1.5(PV阶段，n=6)和10(EV阶段，n=6)。

总RNA通过华大智造MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装V2.1构建成链特异性cDNA文库并进行高通量测序。简要步骤如下：首先通过oligo-dT富集样本中的mRNA，然后再片段化和逆转录；

在接头连接和PCR扩增后，将cDNA文库转化成DNA纳米球并在DNBSEQ平台上完成两端100bp(PE100)的测序。

生信分析及目标基因的确定

通过FastQC v0.11.9评估数据质量，然后使用Trinity v2.845进行从头转录组组装，并指定Trinity中每个样本的卵巢发育阶段(PV/EV)。使用Trinity附带的align_and_estime.pl脚本处理原始读取，使用Bowtie v1.2.0校准读取，然后使用RSEM v1.3.2和SAMtools v1.8在基因水平上进行量化。使用Transdecoder v5.5.0识别组装的转录本序列中的候选编码区。通过Trinotate v3.2.1并结合UniProtKB/SwissProt数据库中BLASTx和BLASTp的信息进行功能注释。

在注释的转录组上搜索编码构成细胞连接蛋白的靶基因，即GJs和TJs，以及参与网格蛋白介导的内吞作用、细胞内囊泡运输和Vtg加工的基因，检索其推导的蛋白序列，同时通过NCBI-BLASTp搜索它们对应于欧洲鳗鱼的基因命名，并对这些靶基因进行差异表达(Differential Expression, DE)分析。对于过滤后的基因，当发现多个基因ID与相同的功能注释相关联时，根据其最高读取计数仅使用一个基因ID，除非它们在核苷酸和蛋白质比对后确认对应于不同的基因序列。此外，使用DeSeq2 v1.26.0进行计数转换后，使用R包pheatmap v1.0.12可视化与Vtg摄取相关途径的基因热图。

根据Vtgr的完整开放阅读框推导出其对应的蛋白质序列，使用NCBI上的CD-Search工具对其保守结构域进行分析，并进行系统发育分析。为了构建系统发育树，从NCBI中检索了不同物种中LDLR家族成员(低密度脂蛋白受体8, LR8；低密度脂蛋白受体相关蛋白13, Lrp13；低密度脂蛋白受体相关蛋白4, LRP4)的氨基酸序列。在使用ClustalW算法对齐序列后，使用最大似然法在MEGA v7中构建系统发育树。

仅供研究使用，不适用于临床诊断

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
埃尔斯米尔湖捕获的野生短鳍鳗	 <p>MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装V2.1</p> <p>MGISEQ-2000 基因测序仪</p>	<p>Trinity Bowtie RSEM SAMtools Transdecoder DeSeq2 ClustalW MEGA等</p>	<p>确认参与调节 Vtg 摄取的基因</p>

结果

卵巢发育阶段的特征

当从PV阶段发展到EV阶段时，GSI、HIS和OD都显著增加。进一步的卵巢组织学分析，证实了根据形态学特征确认的发育阶段。与PV卵母细胞相比，由于脂滴和卵黄蛋白的大量积累(Vtg掺入)，EV卵母中的卵母细胞大小明显增加，PV卵母细胞仅显示少量脂滴，而其细胞质中没有Vtg积累的迹象(图1)。

De Novo转录组和下游分析

采用DNBSEQ平台设备进行测序；每个样本的平均测序数据量为1425万条PE100 reads，共产生了282469个来自171620个推测基因的转录本，其中功能注释了25.6%。滤除低表达基因后，对保留的32447个基因中的20810个基因(64.1%)进行了功能注释。初始聚类分析后表明，样本聚集成两个不同的表型类别，分别为PV和EV。

在PV和EV转化过程中，3个生物学过程(内吞作

用、膜组织和阳离子跨膜转运调控)和1个分子功能(钾离子通道抑制活性)基因表达上调，但在各GO组别中有15项存在下调，而这些基因主要与RNA代谢和卵壳形成有关。最终发现共有4878个基因存在差异表达，当从PV阶段发展到EV阶段时，有2851个基因表达上调，2027个基因表达下调(如图2和3)。

PV-EV发展过渡期间细胞连接的基因表达

在已鉴定的25个编码不同类型的TJ组成蛋白基因中，有7个基因存在差异表达。在PV向EV转化的过程中，只有2个基因表达上调，而5个基因表达下调。目前，与来自其他硬骨鱼类获得的证据相比，这进一步强化了TJ组成蛋白丰度的阶段特异性变化可能有助于调节VTG细胞间转运这一观点。另外，发现了5个编码间隙连接(Gap Junction, GJ)蛋白的基因在不同阶段表达没有明显的差异，因此不支持间隙连接蛋白参与调节VTG摄取的化学屏障假设(如表1)。

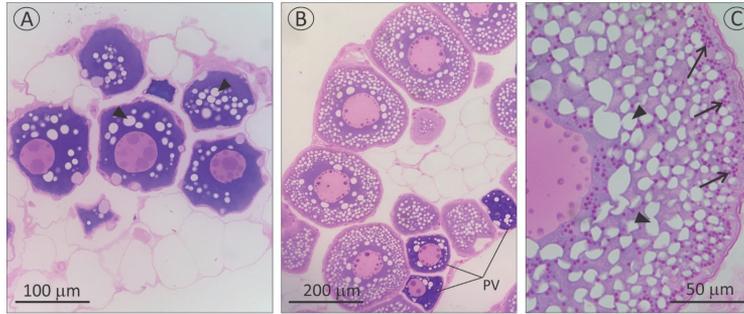


图1. 野生欧洲鳗鱼(2019年)的卵黄发生前期(PV: (A))和卵黄形成早期(EV: (B,C))卵巢的组织切片。卵母细胞大小的显著增加和卵黄蛋白(箭头)的存在将EV阶段和PV阶段区分开。如(B)所示, EV卵巢通常含有很少的PV卵母细胞。黑色箭头: 脂滴。

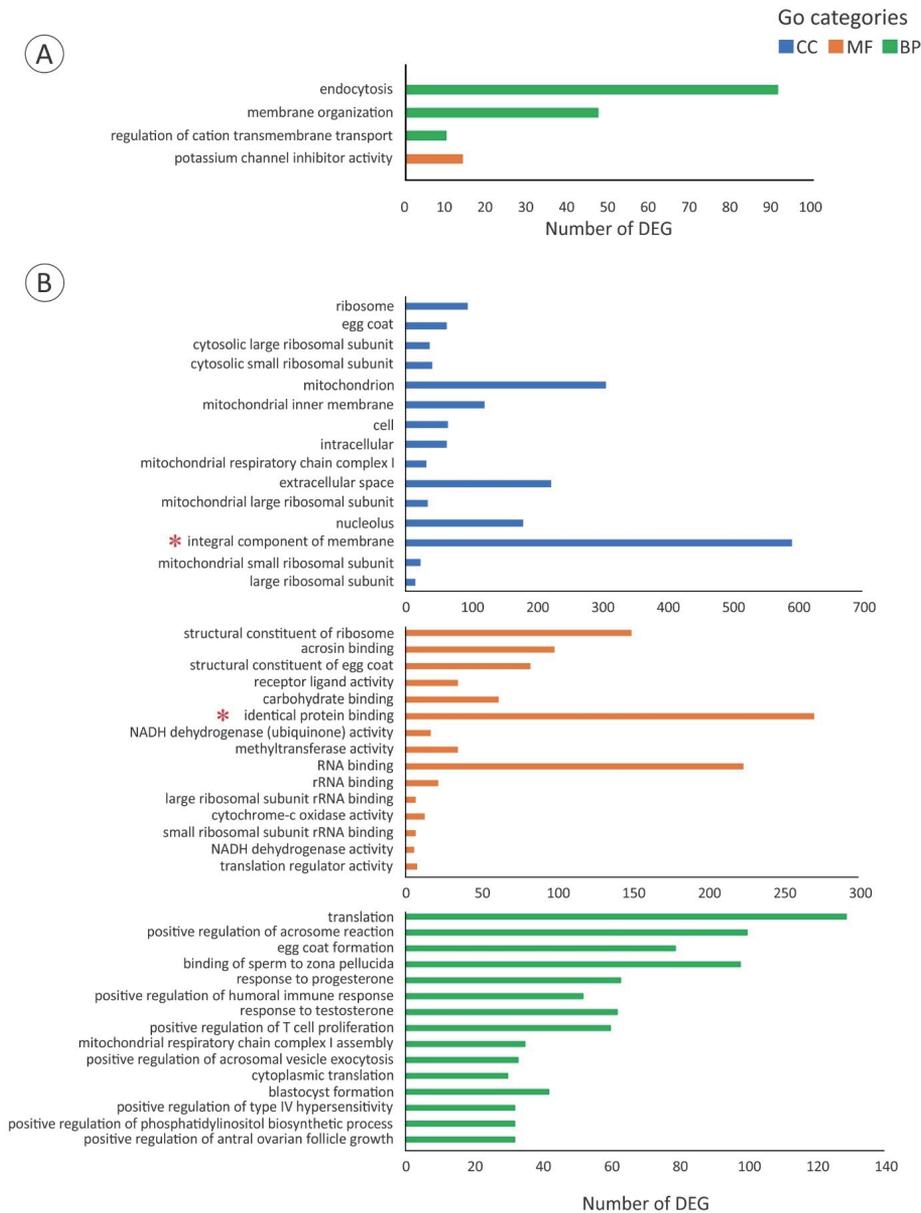


图2. (A) 当从PV阶段进展到EV阶段时, 欧洲鳗鱼卵巢中所有上调的GO类别。(B) 在PV-EV过渡期间, 来自生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞成分(CC)类别的15个下调的GO类别。膜的组成部分和相同的蛋白质结合类别带有红色星号。

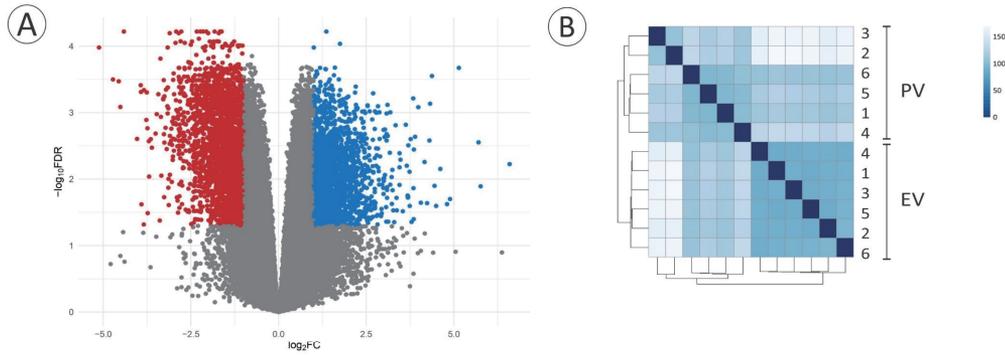


图3. (A) 火山图显示 PV 和 EV 阶段欧洲鳗鱼卵巢组织之间的表达基因有显著的差异。在选定的阈值(q 值 < 0.05 ; $1 \geq \log_2FC \geq 1$)下, 32447 个基因中共有 4878 个基因存在差异表达。虽然 2027 个基因表达下调(蓝点), 但在 PV-EV 过渡期间, 2851 个基因表达上调(红点)。(B) 热图显示欧几里得距离的样本聚类。每个样本(编号 1-6)代表对应于 PV 或 EV 阶段的生物复制。

Gene ID TRINITY	Annotation	A. australis BLASTp HitGene Associated	Log ₂ FC	p Value	PV Reads ± SEM	EV Reads ± SEM
Down-Regulated Genes during the PV-EV Transition						
DN1981_c0_g1	claudin-14 [H. sapiens]	claudin-76-like [XP_03528086.1]/LOC118235138	2.24	0.02	455 ± 12.1	147 ± 3.8
DN3618_c0_g1	claudin-3 [R. norvegicus]	claudin-3-like [XP_03529832.1]/LOC118236501	1.70	0.02	20.8 ± 4.7	9.8 ± 2.1
DN7995_c0_g1	MARVELD1 [H. sapiens]	MARVELD1 [XP_0352119.1]/neuridin	1.22	<0.01	391.3 ± 20.6	257.5 ± 36.6
DN5532_c0_g1	claudin-like protein ZF-A89 [D. rerio]	claudin-like protein ZF-A89 [XP_035288223.1]/LOC118235193	1.13	<0.01	542.7 ± 65.3	356.2 ± 39.2
DN1688_c0_g1	jam2a [D. rerio]	jam2a [XP_035269382.1]/jam2a	1.12	<0.01	252.2 ± 13.5	174.2 ± 8.2
Up-regulated genes during the PV-EV transition						
DN1065_c0_g1	claudin-12 [P. abelii]	claudin-12 [XP_035258512.1]/cldev12	-1.03	<0.01	74.5 ± 14.4	233 ± 30.4
DN4344_c0_g2	MARVELD2 [X. tropicalis]	MARVELD2-like [XP_035246633.1]/LOC118212123	-1.24	<0.01	92.2 ± 12.4	323.5 ± 29.5
Not differentially expressed between PV and EV stages						
DN1981_c0_g1	claudin-7a [D. rerio]	claudin-7a-like [XP_03528086.1]/LOC118235138	0.87	0.04	309.3 ± 20.6	266.8 ± 42.6
DN2224_c0_g1	claudin-7a [D. rerio]	claudin-7a-like [XP_03528086.1]/LOC118235138	0.13	0.81	2309.4 ± 395.7	2960 ± 400
DN1172_c0_g1	claudin-like protein ZF-A89 [D. rerio]	claudin-like protein ZF-A89 [XP_035287488.1]/LOC118234813	0.37	<0.01	52,673.3 ± 3151.4	30,285.6 ± 1014.1
DN2802_c0_g2	claudin [M. musculus]	claudin-8-like [XP_035242392.1]/LOC118210375	-0.43	0.36	10.2 ± 1.9	22.2 ± 3.2
DN1963_c0_g1	claudin-11 [R. norvegicus]	claudin-11a [XP_035278421.1]/cldev11a	-0.70	0.08	14.8 ± 2.4	35.8 ± 3.6
DN1142_c0_g1	jam3b [D. rerio]	jam3b [XP_035242887.1]/jam3b	-1.13	0.14	16.8 ± 6.3	55.7 ± 15.9
DN2192_c0_g1	jam3b [D. rerio]	jam3b-like [XP_035269323.1]/LOC118223892	0.59	0.34	10.7 ± 1.9	11.7 ± 2.3
DN6434_c0_g1	occludin [R. norvegicus]	occludin-like [XP_035245492.1]/LOC118212103	0.24	0.23	877.5 ± 99.6	998.8 ± 41.3
DN5510_c0_g1	Lsr [Anguilla japonica]	Lsr [XP_035263346.1]/lwr	0.28	0.31	625.3 ± 72.6	698.7 ± 74.5
DN4811_c0_g1	LDLR1 [Anguilla japonica]	LDLR1 [XP_035250686.1]/ldlr1a	-0.29	0.07	3766.9 ± 339.2	5119.4 ± 317.7
DN9487_c0_g1	LDLR2 [Anguilla japonica]	LDLR2 [XP_035250686.1]/LOC118214609	-0.51	0.15	11.2 ± 0.9	24.6 ± 1.5
DN198_c0_g1	tight junction ZO-1 [C. familiaris]	tight junction ZO-1-like [XP_035272541.1]/LOC118222177	-0.48	0.02	1066.7 ± 132.1	1836 ± 99.2
DN3322_c0_g1	tight junction ZO-1 [C. familiaris]	tight junction ZO-1-like [XP_035252267.1]/LOC118215021	0.04	0.89	84.3 ± 5.8	126.5 ± 10.9
DN7765_c0_g1	tight junction ZO-2 [M. musculus]	tight junction ZO-2-like [XP_035250252.1]/LOC118229445	0.87	0.01	460.5 ± 51.0	303.5 ± 84.4
DN5748_c0_g1	tight junction ZO-2 [H. sapiens]	tight junction ZO-2a [XP_035247381.1]/zp2a	<-0.01	0.99	1619.3 ± 200.9	1968.6 ± 124.7
DN2077_c0_g1	tight junction ZO-3 [H. sapiens]	tight junction ZO-3 [XP_035271957.1]/zj3	-0.40	0.03	277.5 ± 270.3	470.8 ± 221.7
DN2926_c0_g1	MARVELD3 [H. sapiens]	MARVELD3 [XP_035270498.1]/mch211-91a24.4	0.33	0.42	525.5 ± 82.8	584.05 ± 94.0
DN4344_c0_g1	MARVELD2 [X. tropicalis]	MARVELD2 [XP_035250686.1]/neuridin	-0.1	0.50	1209.8 ± 100.3	1524.2 ± 93.8
DN7029_c0_g1	gj gamma 1 protein [D. rerio]	gj gamma 1 protein-like [XP_035250527.1]/LOC118214562	-0.31	0.03	787 ± 81	1270.8 ± 47.1
DN998_c0_g1	gj beta-3 protein [R. norvegicus]	gj beta-3 protein-like [XP_035290867.1]/LC118236820	-0.15	0.23	5111.3 ± 429.3	6044.8 ± 236.4
DN5751_c0_g1	gj beta-4 protein [R. norvegicus]	gj beta-4 protein-like [XP_035230257.1]/LC118210192	0.70	<0.01	1816 ± 183.3	167.2 ± 13.1
DN15444_c0_g1	gj beta-7 protein [H. sapiens]	cornein 28 [XP_035277334.1]/cx28.8	1.27	0.09	36.8 ± 8.1	24.8 ± 6.3
DN12469_c0_g1	gj 32 protein [M. musculus]	cornein 36.5 [XP_035280840.1]/cx36.5	-0.88	0.02	41.7 ± 6.1	114.8 ± 15.3

表1. 欧洲鳗鱼卵巢组织从 PV 阶段到 EV 阶段的过程中编码细胞连接的基因表达。

PV-EV转化过程中与受体介导的内吞机制和VTG加工相关基因的表达

利用RNA-seq进一步分析与VTG识别、网格蛋白介导的内吞作用、囊泡运输的分子机制和VTG蛋白水解相关的基因表达。在欧洲鳗卵巢转录组中发现了2个编码特定的Vtgrs基因(来自LDLR家族的

Lr8和Lrp13), 但是它们在EV和PV阶段间在表达上没有明显的差异, 强化了推定Vtgr的表达不是VTG摄取的限制因素的观点。在转录组学中发现, 除了组织蛋白酶L1和nothepsin基因表达下调外, 大部分组织蛋白酶在PV和EV阶段没有差异表达, 表明组织蛋白酶可能在转录后受到调控。

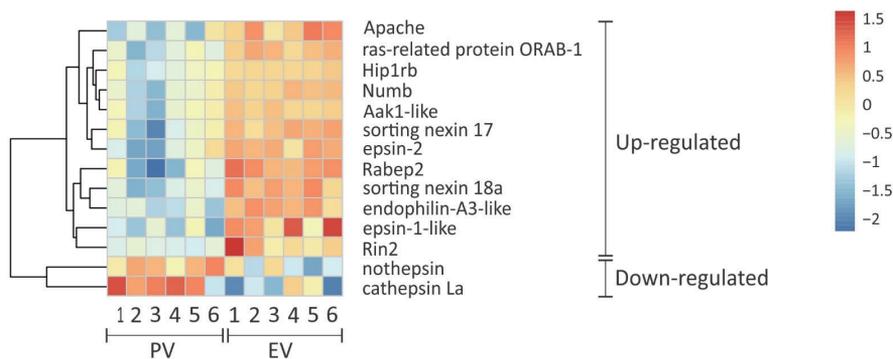


图4. 参与网格蛋白介导的内吞作用、囊泡运输和蛋白水解的差异表达基因的热图, 这些基因可能参与 A. australis 的 Vtg 摄取途径。以颜色强度表示在 PV 阶段和 EV 阶段之间比较的卵巢基因表达。从红色到蓝色的色阶梯度分别代表从高到低的基因表达水平。显示了 PV-EV 转换过程中上调和下调的基因。每行代表一个基因在 PV 阶段或 EV 阶段(列)生物复制中的表达。

仅供研究使用, 不适用于临床诊断

总结

本研究确定了编码TJ组成蛋白的基因在PV-EV转化过程的差异表达表明了其对调控Vtg进入卵母细胞表面的作用；网格蛋白介导的内吞作用和囊泡转运元件的基因在PV-EV转化过程也明显上调，表明它们可能是调控Vtg到达卵泡膜积累的重要因素；在欧洲鳗中发现了两个编码Vtgrs的基因，分别代表LD，LR表基因家族的Lr8(包括Lr8+/-变体)和Lrp13成员。

本研究中RNA-Seq测序方案采用了华大智造相关建库试剂盒并在DNBSEQ测序平台上完成了相关测序工作。MGISEQ-2000采用全新的载片系统，能够灵活支持多种不同的测序模式，并采用优化设计的光学及生化系统，满负荷PE100(FCL)测序仅需约38小时。



基因测序仪MGISEQ-2000

参考文献

1. Babio, L., Lokman, P.M., Damsteegt, E.L. and Dutoit, L. (2022) Are Cell Junctions Implicated in the Regulation of Vitellogenin Uptake? Insights from an RNAseq-Based Study in Eel, *Anguilla australis*. *Cells* 11, 550.
2. Parma, L., Bonaldo, A., Pirini, M., Vii Trends Parmeggiani, A., Bonvini, E., et al. (2015). Fatty acid composition of eggs and its relationships to egg and larval viability from domesticated common sole (*Solea solea*) breeders. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 186–194. doi: 10.1111/rda.12466
3. Charniauxcotton, H. (1985). Vitellogenesis and its control in *Malacostracan crustacea*. *Am. Zool.* 25, 197–206.
4. Yao, R., Wong, N.K., Zhang, X., Zhu, C. and Chen, T. (2020) Vitellogenin Receptor (VgR) Mediates Oocyte Maturation and Ovarian Development in the Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Physiology* 11, 485.
5. Morini, M., Lafont, A.G., Maugars, G., Baloché, S. and Pérez, L. (2020) Identification and stable expression of vitellogenin receptor through vitellogenesis in the European eel. *animal*, 1-10.

推荐订购信息

产品类型	产品名称	产品货号
仪器	基因测序仪MGISEQ-2000RS	900-000035-00
	MGISP-100RS自动化样本制备系统	900-000070-00
	MGISP-960RS 自动化样本制备系统	900-000100-00
软件	MegaBOLT生信分析加速器(工作站式服务器)	970-000085-00
建库试剂	MGIEasy RNA方向性文库制备试剂套装 V2.0 (16 RXN)	1000005270
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(FCL PE100)	1000012554

深圳华大智造科技股份有限公司

深圳市盐田区北山工业区综合楼11栋

☎ 4000-688-114

🌐 www.mgi-tech.com

✉ MGI-service@mgi-tech.com

股票简称：华大智造

股票代码：688114



仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司所有,未经本公司书面许可,任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。

版本：2023年10月版

撰稿：高静 肖阳

责任编辑：王其伟

审稿：江遥