

蓝贻贝在镉胁迫下microRNAs表达调控的变化

基于华大智造DNBSEQ测序平台开展miRNA调控应激反应的研究案例

深圳大学彭晓教授团队对MicroRNAs在水生物种中具有复杂功能进行了多年研究。该团队基于华大智造DNBSEQ测序平台，对暴露于镉环境下的蓝贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)的不同组织(全组织、消化腺、鳃和性腺)进行了小RNA测序，发现107个已知、32个新miRNAs显著差异表达。

相关成果于2021年发表在*Ecotoxicology and Environmental Safety*杂志，题为“Stress responses in expressions of microRNAs in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium”¹。

推荐应用：海洋组学

推荐机型：MGISEQ-2000RS

• 测序准确性高

DNBSEQ 测序平台采用了先进的联合探针锚定聚合技术和DNB技术，增强了信号强度，也可有效提高测序准确度。

• 为海洋生物研究提供可靠平台

基于 DNBSEQ 测序平台，对暴露于镉环境下的蓝贻贝进行小RNA测序，发现107个已知和32个新miRNAs的显著差异表达。



背景介绍

镉 (Cd) 污染在渤海水域、沉积物和许多海洋物种中广泛存在²。镉作为一种典型的金属污染物，可对海洋生物产生多种不利影响，如对免疫系统产生负面影响，诱导氧化应激³。研究发现，镉会干扰蓝贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 和菲律宾蛤 (*Ruditapes philippinarum*) 的能量代谢。由于镉已成为渤海海域最严重的金属污染物之一，因此有必要研究镉对海洋生物的毒害作用。

miRNAs 通过多种生物过程在许多海洋物种中发挥关键作用⁴。作为一类含有 18-24 个核苷酸 (nt) 的非编码 RNA 分子，miRNAs 包含了一类新型内源性小 RNA，通过引导其靶 mRNA 降解或翻译抑制来调节基因表达⁵。Chen 等人 (2014) 报道了暴露于急性病毒坏死病毒感染的扇贝法氏衣藻的 miRNA 表达特征，miRNA 在海洋青鳉不同组织中发挥重要作用，如大脑的神经系统发育和肝脏的脂质代谢⁶。在长牡蛎中，cgi-miR-2d 调节胆碱能神经内分泌系统平衡的过程脾弧菌感染。这些研究为更好地理解海洋物种复杂的基因调控机制提供了新的见解。

海洋生物经常面临各种环境的污染，研究人员一直致力于探索 miRNA 对环境胁迫的响应机制。miRNAs 可能通过微调基因表达的能力在动物对压力的反应中发挥关键作用。miRNAs 在环境应激反应中的作用已在珊瑚、隐杆线虫和许多其他动物中被报道过¹。然而，目前还没有对环境胁迫下的蓝贻贝进行 miRNA 的研究¹。

研究描述

水生生物中的 MicroRNAs 具有复杂的功能，但科研界对其在环境胁迫下的作用知之甚少。本研究中，深圳大学彭晓教授团队使用华大智造 DNBSEQ 测序平台对暴露于镉环境下的蓝贻贝的不同组织（全组织、消化腺、鳃和性腺）进行了小RNA 测序并进行生物信息学分析以研究差异表达的 miRNAs 所发挥的作用。

结果表明，蓝贻贝中总共有 107 个已知成熟 miRNAs 和 32 个新 miRNAs 显著 ($p < 0.05$) 随镉暴露而改变。对差异表达 miRNA 预测靶基因的功能分析表明，镉诱导蓝贻贝的免疫毒性和细胞凋亡，并影响蓝贻贝的脂质代谢和外生物代谢。这些研究结果为进一步探索 miRNA 介导的基因调控机制提供了有益的线索。

实验方法

样本收集和 DNA 提取

该团队收集了180只蓝贻贝样本，并将其随机分为3组，包括对照组、5和50 $\mu\text{g/L}$ 镉暴露组，在实验处理后，从每个贻贝上解剖整个组织和三种软组织（消化腺、鳃和性腺），然后将所有样本保存在 -80°C 下，用于重金属和 miRNA 分析。使用 TRIzol 试剂 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 提取总RNA。为了确定最大的 miRNAs 数量，将所有组织样本的总RNA以相等的比例混合。

MicroRNA 测序

研究团队采用华大智造小RNA建库策略并在 DNBSEQ 测序平台上完成了高深度测序工作。去除含有带有5'接头污染物的 polyN、不含3'接头或插入标签的 reads、含有 poly A、T、G 或 C 的 reads、低质量 reads 和短于 18 nt 的 reads 以获得高质量测序 reads。将高质量的 reads 用 Bowtie 无错配比对到参考序列上，分析它们在参考序列上的表达和分布。为了去除来自蛋白质编码基因的标记，将重复序列、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 和 sRNA 标记比对到 RepeatMasker、Rfam 数据库。

将高质量 reads 与 miRBase 数据库中所有动物的 miRNA 前体/成熟 miRNA 进行比较，以确定样品中 miRNA 家族（非物种特异性）的序列和数量。通过评估 miRNA 前体发夹结构的特征来预测新的 miRNA。

测序数据分析

将 miRNA 数据比对到与蓝贻贝有密切遗传关系的蓝贻贝现有基因组中。为了确定对照组和两种不同剂量 cd 处理组之间蓝色贻贝中差异表达的 miRNAs，表达数据经过 \log_2 变换并绘制在散点图上。简单地说，程序如下：(1) 将三个文库的 miRNA 表达数据归一化，以获得每百万读的转录本数 (TPM)。归一化公式：归一化表达式 = 映射读数 / 读总数 * 1×10^6 ；(2) 由归一化表达式计算 fold-change 和 p 值。p 值通过 q 值进行调整。(3) 最后生成 \log_2 -ratio 图和散点图。当一个 miRNA 在三个库之间的归一化表达为 0 时，其表达值被调整为 0.01（因为 0 不能在对数图上绘制）。如果三个文库中某一特异性 miRNA 归一化表达量 < 1 ，则不需要该 miRNA 进行进一步的差异表达分析。因此，计算得到的基因表达量可直接用于比较不同处理间基因表达量的差异。

剩下的 reads 用软件进行进一步比较 RepeatMasker, Rfam 数据库，以去除可能的 mRNA, rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA 和重复序列。然而，一些 sRNA 标记可能映射到多个类别。为了确保每个唯一的 miRNA 只被映射到一个注释，应用了以下优先级规则：rRNA 等 (GenBank > Rfam) > 已知 miRNA > 重复 > 外显子 > 内含子。然后将所有 clean reads 分为以下类别：exon_sense、exon_反义、intronsense、intron_反义、miRNA、rRNA、repeat、scRNA、snRNA、snoRNA、srpRNA、tRNA 和 unknown（未比对到任何已知参考数据库的序列）。随后进行 GO 聚类以及 KEGG 通路分析。

样本采集	文库制备和测序	生信分析	结果分析
180 只蓝贻贝样本,分为对照组、5 和 50 $\mu\text{g/L}$ 镉暴露组。实验处理后,从每个贻贝上取多种组织用于后续实验	 MGIEasy Small RNA 文库制备试剂套装  MGISEQ-2000 基因测序仪	Bowtie miRBase RepeatMasker Rfam database Gene Ontology KEGG	miRNA 测序分析比对 不同的 miRNA 表达模式分析 GO 富集和 KEGG 通路分析

结果分析

miRNA 测序数据中检测到的 miRNA 汇总

从蓝贻贝样本中构建了 12 个 miRNA 文库。表 1 所示每个贻贝样本检测到的 miRNAs 数量。对这 12 个文库的分析证实了 miRNA 序列在这些文库中富集。miRNAs 的长度数据显示,所有文库的大小分布相似,在 17 - 32 nt 之间,并表现出双峰分布模式,22 nt 是最丰富的类,其次是 29、30、21 和 28 nt。

Tissues	Treatments	Known miRNA count	Novel miRNA count
Whole tissue	Control	100	28
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	103	29
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	99	28
Digestive gland	Control	100	30
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	96	29
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	97	29
Gill	Control	99	30
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	100	29
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	104	29
Gonad	Control	96	24
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	90	25

表1. 贻贝样本在镉处理96 h后检测到的miRNA情况汇总。

miRNA 测序分析比对结果汇总

表 2 列出了从贻贝软组织获得的序列信息。过滤掉低质量序列后,12 个样本平均获得 26993797 个 miRNAs。图 1 显示了各文库中 RNA 类的组成。在 clean reads 中,大量的 miRNAs 被映射到贻贝基因组 (表 2)。对这 12 个文库的分析证实了 miRNA 序列在这些文库中富集。miRNAs 的长度数据显示,所有文库的大小分布相似,在 17 - 32 nt 之间,并表现出双峰分布模式,22 nt 是最丰富的类,其次是 29、30、21 和 28 nt。

Tissues	Treatments	Raw tag count	Total tag	Mapped tag	Percentage of Mapped tag (%)
Whole tissue	Control	29,405,689	28,050,597	4,057,381	14.46
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	29,243,768	27,514,012	6,255,413	22.74
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	26,857,869	25,324,868	3,438,338	13.58
Digestive gland	Control	28,068,451	26,789,951	11,677,717	43.59
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	28,324,610	25,915,286	11,673,423	45.04
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	29,936,911	27,854,771	11,799,772	42.36
Gill	Control	28,182,414	26,945,210	15,124,380	56.13
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	27,975,463	25,967,304	21,144,264	81.43
	50 $\mu\text{g/L}$ Cd	29,743,654	27,981,423	24,048,131	85.94
Gonad	Control	28,933,285	27,820,171	1,789,490	6.43
	5 $\mu\text{g/L}$ Cd	29,385,455	27,584,619	217,1279	7.87

表2. 贻贝样本在镉暴露96 h后的测序数据汇总,以及与镉暴露贻贝参考基因组的标记比对统计。

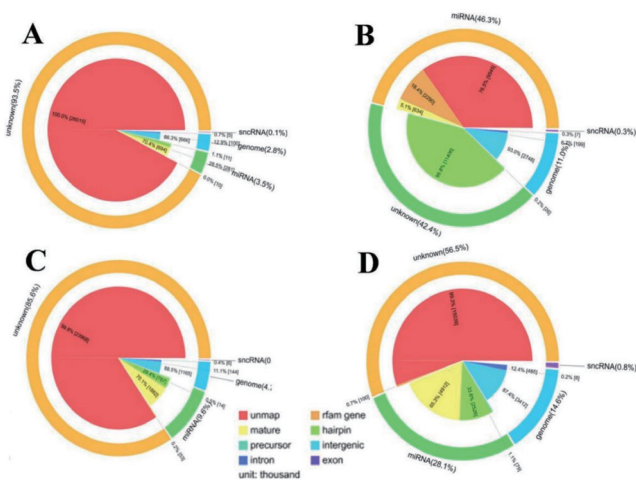


图1.不同类型的sRNA在贻贝不同组织中的比例。为了确保每个sRNA只对应一个注释,遵循以下优先规则:miRNA > piRNA > snoRNA > Rfam >其他sRNA (A:生殖腺, B:鳃, C:整个软组织, D:消化腺)。

不同的 miRNA 表达模式

在蓝贻贝组织中发现了 107 个已知 miRNAs 和 32 个新 miRNAs(表 1)。共有 26 个非重复性 miRNAs 在镉处理中被鉴定为差异表达 ($p < 0.05$)。总的来说,66 个已知 miRNAs 和 19 个新 miRNAs 发生了显著变化(图 2),大多数差异表达的 miRNAs 在镉暴露后上调。

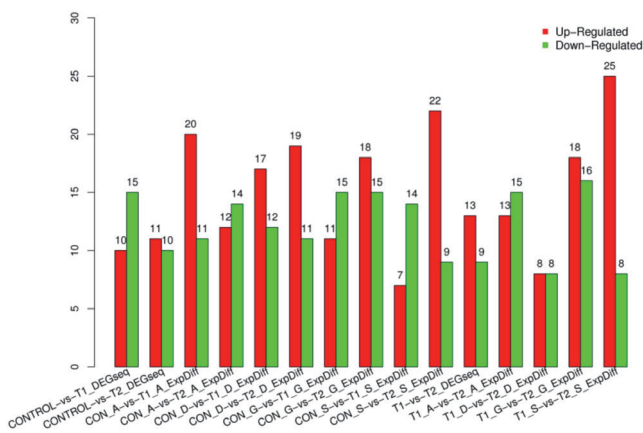


图2. 镉暴露下贻贝中差异表达的miRNA。X轴为差异表达sRNAs, Y轴为筛选的DEGs数量,绿色表示下调,红色表示上调 (CON: Control组, T1: 5 μg/L 镉处理组, T2: 50μg/L 镉处理组; A为蓝贻贝的整个软组织, G为蓝贻贝的鳃, D为贻贝的消化腺, S为贻贝的性腺)。

GO 富集和 KEGG 通路分析

为进一步了解 miRNAs 的生物学功能,该研究团队预测了差异表达 miRNAs 的靶基因。随后,通过 GO 分析确定富集的功能组 ($p < 0.05$)。这些靶基因主要参与生物过程、细胞成分和分子功能类别。同时也鉴定了富集的代谢途径和信号转导通路(图 3)。20 条靶基因显著富集的通路 ($p < 0.05$),主要涉及剪切体 (Spliceosome), 细胞微丝骨架调控 (Regulation of actin cytoskeleton), 急性髓样白血病 (Acute myeloid leukemia), VEGF 信号通路 (VEGF signaling pathway), 溶酶体 (Lysosome), GnRH 信号通路 (GnRH signaling pathway), 内吞作用 (Endocytosis), 肺结核 (Tuberculosis) (图 3)。此外,在 5、50 μg/L 镉处理下,通过 KEGG 分析发现所有 miRNAs 的靶基因在癌症中的蛋白质多糖 (ko05205) 和长时程抑制 (ko04730) 这两条信号通路中富集的最多。

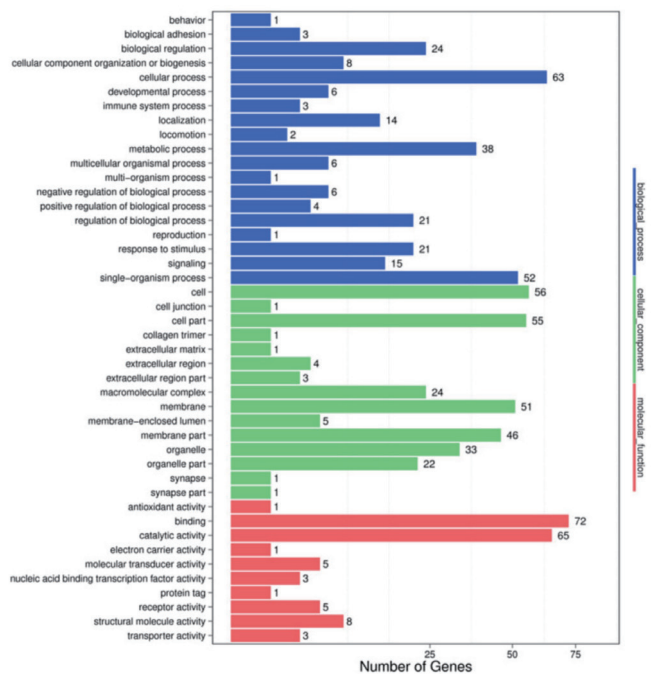


图3. 镉暴露下贻贝GO功能的分类。X轴表示不同表达基因 (DEGs)的数量, Y轴表示GO 功能。所有的GO功能被分为三个类别:蓝色表示生物过程,棕色表示细胞成分,红色表示分子功能。

总结

深圳大学彭晓教授团队通过利用基于华大智造 DNBSEQ 测序平台的高深度 small RNA 测序技术和生物信息学分析对镉胁迫下的紫贻贝不同组织的 miRNAs 进行鉴定。结果表明, 总共有 107 个已知成熟 miRNAs 和 32 个新 miRNAs, 共有 26 个非重复性 miRNAs 在镉处理中被鉴定为差异表达 ($p < 0.05$)。对差异表达 miRNA 预测的靶基因功能分析表明, 镉诱导贻贝的免疫毒性和细胞凋亡, 并影响加洛省毛贻贝的脂质代谢和外生物代谢。这些研究结果为进一步探索 miRNA 介导的基因调控机制提供了有益的线索。



基因测序仪 MGISEQ-2000RS

参考文献

1. Yu D, Peng Z, Wu H, Zhang X, Ji C, Peng X. Stress responses in expressions of microRNAs in mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Apr 1;212:111927.
2. Gao, X., Zhou, F., Chen, C., 2014. Pollution status of the Bohai Sea: an overview of the environmental quality assessment related trace metals. *Environ. Int.* 62, 12–30.
3. Company, R., Serafim, A., Bebianno, M., Cosson, R., Shillito, B., Fiala-Medioni, A., 2004. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation on the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus axoricus*. *Mar. Environ. Res.* 58, 377–381.
4. Burgos-Aceves, M., Cohen, A., Paoletta, G., Lepretti, M., Smith, Y., Faggio, C., Lionetti, L., 2018a. Modulation of mitochondrial functions by xenobiotic-induced microRNA: from environmental sentinel organisms to mammals. *Sci. Total Environ.* 645, 79–88.
5. Burgos-Aceves, M., Cohen, A., Smith, Y., Faggio, C., 2018b. A potential microRNA regulation of immune-related genes in invertebrate haemocytes. *Sci. Total Environ.* 621, 302–307.
6. Chen, G., Zhang, C., Jiang, F., Wang, Y., Xu, Z., Wang, C., 2014. Bioinformatics analysis of hemocyte miRNAs of scallop *Chlamys farreri* against acute viral necrobiosis virus (AVNV). *Fish. Shellfish Immunol.* 37, 75–86.

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	MGI Easy Small RNA 文库制备试剂盒(24 RXN)	940-000196-00
测序试剂	MGISEQ-2000RS 高通量测序试剂套装(FCL SE50)	1000012551

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、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：2022年10月版

撰稿：陈一鸣 周浩

责任编辑：王其伟

审稿：江遥