

文章编号 :1000 - 0615(2006)05 - 0690 - 05

cDNA 芯片结合抑制性差减杂交技术 构建对虾白斑综合征病毒表达基因和螯虾免疫相关基因文库

曾 勇¹, 陆承平¹, 朱建中²

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095 ;

2. 南京医科大学, 江苏 南京 210029)

摘要 :以克氏原螯虾做为对虾白斑综合征病毒(WSSV)的增殖模型, 试验组接种 WSSV, 对照组接种 PBS。分别以试验组为检测组(tester)、对照组为驱逐组(driver), 进行正向抑制性差减杂交 ;以对照组为 tester、试验组为 driver, 进行反向 SSH。将获得的正、反向差减杂交产物克隆入质粒载体 PinPoint™ Xa-1 T-Vector, 再转化大肠杆菌 DH5 α , 共构建了 2 个分别含 1620 和 400 个克隆的正、反向差减文库。经 PCR 扩增, 1514 个差减克隆得到产物, 其中正向差减克隆 1221 个, 反向差减克隆 293 个。获得的 PCR 产物经浓缩、变性处理, 用自动点样仪点制于尼龙膜载体上, 制成 cDNA 芯片, 用 cDNA 芯片对 SSH 获得的差减克隆进行鉴定, 共获得差异表达克隆 278 个, 其中攻毒组高表达克隆 255 个, 对照组高表达克隆 23 个。

关键词 :克氏原螯虾 ; 白斑综合征病毒 ; 表达基因 ; 免疫相关基因 ; cDNA 芯片

中图分类号 :Q 785 文献标识码 :A

Construction the cDNA library of expression profiles of penaeid shrimp WSSV and immune genes of crayfish with suppression subtractive hybridization and cDNA chip

ZENG Yong¹, LU Cheng-ping¹, ZHU Jian-zhong²

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China ;

2. Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract :The cDNA of crayfish(*Procambarus clarkii*) infected with white spot syndrome virus(WSSV) were used as tester and that of the control as driver to construct a forward subtraction. A reverse subtraction was performed by used tester as driver and driver as tester at the same time. The subtracted products were cloned into the PinPoint™ Xa-1 T-Vector. Then the recombinated plasmid was transformed into DH5 α . A forward subtracted cDNA library including 1620 clone and a reverse subtracted cDNA library including 400 clone were constructed respectively. Using sequences flanking the cloning site as primers, 1514 clones were amplified from the 2020 clones constructed by suppression subtractive hybridization. 1221 clones of these were got from forward subtraction library and 293 clones from reverse subtraction library. After concentration and degeneration the PCR fragments were robotically printed onto nylon membrane to make a cDNA chip. In the end, 255 positive clones from forward subtraction library and 23 positive clones from reverse subtraction library were detected by cDNA chip.

Key words : *Procambarus clarkii* ; white spot syndrome virus(WSSV) ; expression gene ; immune gene ; cDNA chip

收稿日期 :2005-12-11

资助项目 :国家自然科学基金(30170729)、瑞典国际科学基金(A/3362 - 1)

作者简介 :曾 勇(1967 -) ,男,湖北荆州人, 副研究员, 博士研究生, 主要从事鱼虾病原及免疫的分子生物学研究, 现工作单位为烟台大学化学生物理工学院。E-mail :zy110cn@yahoo.com.cn

通讯作者 :陆承平, E-mail :lucp@mail.njau.edu.cn

对虾白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)给全球的对虾养殖业带来了巨大的损失,针对该病毒的研究也随即在诸多实验室开展起来。其中最为引人注目的成果是完成了该病毒的全基因组测序工作^[1-3],并在此基础上推测了其可能的表达基因,实际情况尚待进一步证实。

对虾属于甲壳类,由于其没有特异性的免疫系统,而其天然免疫系统人们又知之甚少,因此,其疾病防治工作开展起来难度较大。克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*,以下简称螯虾)因其易饲养,天然不带毒,对 WSSV 敏感,已成为研究 WSSV 的理想动物模型^[4]。同时,国外关于甲壳动物的免疫系统研究也多是螯虾作为研究对象^[5,6],积累了一些数据,为进一步的研究打下了基础。

本研究结合 cDNA 芯片与抑制性差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术,以螯虾为动物模型,同时对 WSSV 的表达基因和螯虾的免疫相关基因开展了研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

螯虾购自南京某农贸市场,体重每只约 50 g,水温 22 ℃,实验室饲养 1 周以上,健康存活。

1.2 方法

接毒 白斑综合征病毒(WSSV)青岛株经螯虾传 18 代,本室保存。病毒的提取及接种参照朱建中等^[4]方法进行。对照组螯虾用 0.01 mol·L⁻¹ PBS(pH7.4)腹节肌肉注射,接种量每尾 0.1 mL。

血淋巴的收集 接毒 3 d 以后,用一次性注射器由螯虾心脏采取血淋巴,具体方法参照魏静等^[7]方法进行。所得血细胞 -80 ℃保存备用。

总 DNA 的提取 取少量血细胞于 1.5 mL 一次性灭菌离心管中,蛋白酶 K 消化,常规酚、氯仿法抽提^[8]。

PCR 检测 根据新加坡学者 Zhang 等(2001)公布的对虾白斑综合征病毒的部分基因序列,GenBank 的登录号为 AF411637(WSSV ORF21),设计 1 对引物如下:

P₁ 5'-ATG GGC GTC CAA GTT AGT-3'

P₂ 5'-CAA TAC AGA ATG CGG GTC-3'

以上述 DNA 为模板,对试验组和对照组进行 PCR 检测,以确保后续试验的顺利进行。所用

PCR 仪为 MJ RESEARCH INC PT-100™,PCR 反应体系为:10 × buffer 2.5 μL,25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 3 μL,2.5 mmol·L⁻¹ dNTP 2 μL,P₁,P₂(25 μmol·L⁻¹)各 0.5 μL,Taq 酶(上海 Promega)1 μL(1U),模板 1 μL,去离子灭菌水 14.5 μL,总体积 25 μL。PCR 条件过程共 35 个循环,每个循环步骤如下:94 ℃变性 30 s,43 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min。循环开始前进行 94 ℃预变性 5 min,循环结束后 72 ℃延伸 10 min。

总 RNA 的提取 用 TriPure 分离液(Roche 公司产品,Cat. No. 1667165)提取总 RNA,步骤按说明书进行。

总 RNA 的甲醛变性胶电泳鉴定 参照文献^[8]的方法进行。

mRNA 分离 采用 Oligotex Direct mRNA Mini Kits(QIAGEN 公司产品,Cat. No. 72022),操作按试剂盒说明书进行。

SSH 采用 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(CLONTECH 产品,Cat. No. K1804-1),操作按试剂盒说明书进行。

共进行 3 组 SSH。正向杂交以试验组为 tester,对照组为 driver,以获取 WSSV 的表达基因和螯虾在经受病毒侵袭后机体中特异表达或表达量上升的基因;反向杂交则以对照组为 tester,试验组为 driver,以获取螯虾经受病毒侵袭后表达量下降基因;对照杂交以含 0.2% φX174-Hae III digest DNA 的骨骼肌双链 cDNA(与上述 cDNA 同步合成)为 tester,骨骼肌双链 cDNA 为 driver 进行杂交,以验证正、反向差减杂交结果。

差减文库构建 将正、反向 SSH 获得的克隆插入 PinPoint 质粒表达载体,构建 cDNA 差减文库。

连接产物的转化及扩增 将重组质粒按常规方法转化感受态大肠杆菌 DH5α。挑取单个菌落接种于 96 孔深孔培养板中培养过夜。取 1 mL 菌液用于提取质粒 DNA;另一部分加入终浓度为 15% 的甘油,-30 ℃保存。碱裂解法提取质粒 DNA。以其为模板,以插入片段两侧的质粒载体为引物,扩增插入片段。每 100 μL PCR 体系包括:H₂O 64 μL,10 × Buffer 10 μL,dNTP(2 mmol·L⁻¹)7.5 μL,MgCl₂(25 mmol·L⁻¹)7.5 μL,Spα(5 μmol·L⁻¹)5 μL,Pinpoint(5 μmol·L⁻¹)5 μL,Taq 酶(Promega 公司产品)0.5 μL(2.5 U),质粒模板

1 μL。

PCR 扩增条件为 94 °C 变性 30 s ,58 °C 退火 30 s ,72 °C 延伸 1 min。35 个循环 ,循环开始前 94 °C 变性 5 min ,循环结束后 72 °C 延伸 10 min ,10 °C 保持。

PCR 产物的电泳鉴定 每管取 PCR 产物 1.5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳 ,检测是否含有插入片段。

cDNA 芯片制备及检测 cDNA 芯片的制备及检测由上海中科开瑞生物芯片科技股份有限公司完成。

2 结果

2.1 WSSV 的 PCR 鉴定

用设计的引物进行 PCR 扩增 ,在攻毒的雌、雄虾中均扩增出预计的 675 bp 左右的片段 ,而对照的雌、雄虾中未扩出条带(图 1)。说明本试验设计的引物检测效果可靠 ,无性别特异性 ,完全可以保证试验的顺利进行。

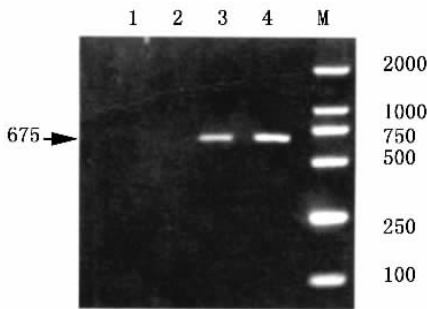


图 1 WSSV 的 PCR 检测

Fig.1 Detecting WSSV by PCR

- 1. 雌性对照虾 2. 雄性对照虾 3. 雌性攻毒虾 ;
- 4. 雌性攻毒虾 ,M. marker(DL2000 ,TaKaRa)
- 1. control group(female) 2. control group(male) ;
- 3. experiment group(female) 4. experiment group(male)

2.2 总 RNA 电泳鉴定

提取的攻毒组和对照组螯虾的血淋巴细胞总 RNA 经紫外分光光度计检测 ,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分别为 1.89 和 1.83 ,表明纯度较好。电泳图以 18 S 条带为主 ,未见弥散现象 ,表明总 RNA 未发生降解(图 2)。与哺乳类和禽类完全不同 ,其 18 S 含量明显高于 28 S。

2.3 接头连接效率鉴定

以接头和骨骼肌 G3PDH 3 '端为引物的 PCR

扩增量(1,3 号条带 ,片段大小约 750 bp)与以骨骼肌 G3PDH 3 '和 5 '端为引物的 PCR 扩增量(2,4 号条带 ,片段大小约 450 bp)相近 ,表明接头连接效率较高 ,可以进行下一步操作(图 3)。

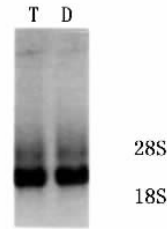


图 2 螯虾总 RNA 电泳

Fig.2 Electrophoresis of total RNA of crayfish

- T :试验组 ,D :对照组
- T :experiment ,D :control

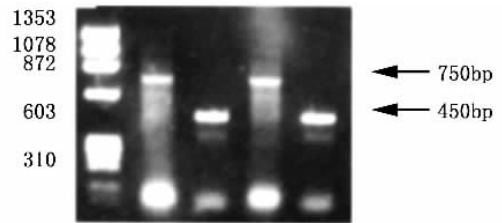


图 3 接头连接效率的检测结果

Fig.3 Results of the ligation efficiency analysis

- 1. 以连接接头 1 的 tester 为模板 ,以接头 1 和 G3PDH 3 '为引物 ;
- 2. 以连接接头 1 的 tester 为模板 ,以 G3PDH 3 '和 5 '为引物 ;
- 3. 以连接接头 2R 的 tester 为模板 ,以接头 1 和 G3PDH 3 '为引物 ;
- 4. 以连接接头 2R 的 tester 为模板 ,以 G3PDH 3 '和 5 '为引物 ;
- M. φX174-*Hae* III digest DNA

Lane 1. PCR products using tester 1(Adaptor1-ligated) as the template and the G3PDH 3 ' primer and PCR Primer 1 ; Lane 2. PCR products using tester 1-1(Adaptor 1-ligated) as the template and the G3PDH 3 ' and 5 ' primers ; Lane 3. PCR products using tester 1-2 (Adaptor 2R-ligated) as the template , and the G3PDH 3 ' primer and PCR Primer 1 ; Lane 4. PCR products using tester 1-2 (Adaptor 2R-ligated) as the template , and the G3PDH 3 ' and 5 ' primers ; Lane M. φX174-*Hae* III digest size markers

2.4 SSH 产物的电泳鉴定

正、反向 SSH 产物均为一弥散的 cDNA 群体 ,大小集中在 300 ~ 600 bp 范围内。而作为对照的骨骼肌 SSH 产物经两轮 PCR 与 Marker 的带形十分相似 ,由于其已加接头 ,所以较 Marker 略大一点 ,说明整个 SSH 操作系统良好(图 4)。

2.5 差减文库

将正向和反向 SSH 产物克隆入 Pinpoint 质粒

载体 构建成分别含 1620 和 400 个克隆的差减文库。

2.6 插入片段的 PCR 扩增

插入片段经 PCR 鉴定 ,75% 以上克隆皆能扩出产物 ,其中正向差减克隆 1221 个 ,反向差减克隆 293 个 ,共计 1514 个。获得分子大小多为 500 bp 左右。如果扣除引物、载体及所加接头序列 194bp ,则实际插入片段大小约 300 bp(图 5)。

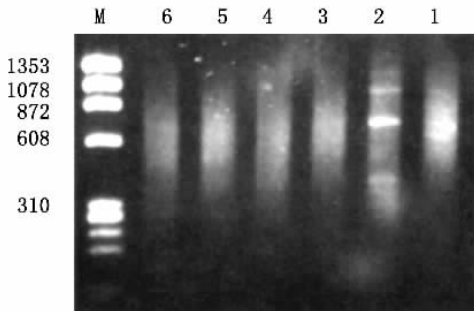


图 4 SSH 产物第二轮 PCR 电泳结果

Fig.4 Electrophoresis of second PCR of SSH products 1~6 分别是正向 SSH 产物、未杂交对照、反向 SSH 产物、未杂交对照、对照骨骼肌 SSH 产物和未杂交对照 ;M : ϕ X174 - *Hae* III digest DNA

Lane 1 - 6 were respectively products of obverse SSH , products of unsubstraction control , products of reverse SSH , products of unsubstraction control , products of skeletal muscle SSH , products of unsubstraction control ;Lane M : ϕ X174 - *Hae* III digest size markers

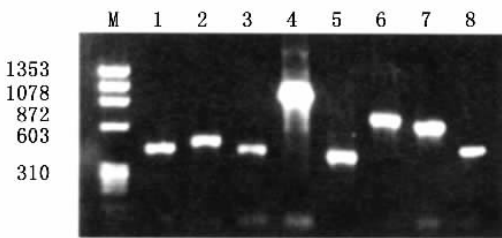


图 5 SSH 插入片段的 PCR 产物电泳鉴定

Fig.5 Electrophoresis of PCR products of the inserted fragments of SSH

1~8 : 分别是插入片段的 PCR 产物 ;M : Marker ϕ X174 *Hae* III digestion

1 - 8 were respectively the PCR products of inserted fragments ; M : Marker ϕ X174 *Hae* III digestion

2.8 cDNA 芯片杂交结果

对两张芯片进行扫描分析 ,取 2 倍以上差异表达基因为阳性。试验共获阳性克隆 281 个 ,除去重复克隆 ,实际得到 278 个 ,其中正向克隆 255

个 ,反向克隆 23 个。10 倍以上差异克隆 22 个。

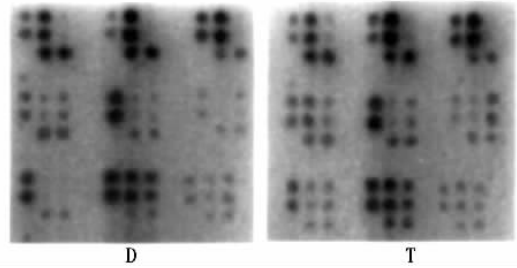


图 6 局部芯片杂交图

Fig.6 cDNA chips

D 对照组 ,T 试验组

D : control T : experiment

3 讨论

在对虾的各种病原引起的疾病中 ,病毒病造成的损失最为惨重 ,而病毒病中又以白斑综合征危害最大 ,其相关研究也最为深入 ,由早期的检测工作到最近的全基因组测序并推导了其表达基因^[1-3] ,而且对部分基因功能进行了研究^[9,10]。由于 WSSV 为一新病毒 ,大部分推导的阅读框都找不到同源基因 ,Yang 等^[2]采用 RT-PCR 和 cDNA 序列分析 ,对其中的部分表达基因进行了鉴定。

本研究利用 SSH 技术这一筛选差异表达基因的新方法 ,结合已报道的 WSSV 基因组全序列 ,在一次性构建病毒表达基因图谱的同时 ,兼顾了感染基因组学的研究 ,利于进一步对 WSSV 的动物模型螯虾的免疫相关基因进行探索。同时结合了 cDNA 芯片这一简便、快速、平行的高通量研究手段 ,使检测效率得以提高。

采用正、反向 SSH 法分离 WSSV 的表达基因和螯虾的免疫相关基因 ,分别获得 1620 和 400 个差减克隆 ,经 PCR 扩增分别得到正向差减克隆 1221 个 ,反向差减克隆 293 个 ,进一步经 cDNA 芯片检测得到正向克隆 255 个 ,反向克隆 23 个。从而快速淘汰了假阳性基因 ,逐步逼近目的基因。

从得到的正、反两个文库可以看出 ,螯虾参与免疫活动的基因较为复杂 ,涉及多个基因。不但一些基因的表达量上升 ,还有部分基因在遭受病毒侵袭后表达量明显下降。Roux 等^[11]即利用定量 RT-PCR 技术发现南美蓝对虾(*P. stylirostris*)在感染 WSSV 后其脂多糖(LPS) β -1,3-葡聚糖结合

蛋白(LGBP)基因表达量明显上升,LGBP识别LPS后可激活甲壳动物重要的非特异免疫系统—酚氧化酶原激活系统(prophenoloxidase activating system, proPO系统),但定量RT-PCR显示酚氧化酶原(proPO)基因除在监测的最初8h呈上升趋势以外,在其随后的24h中其活性呈下降趋势,说明在感染的早期,宿主试图清除感染的病毒,而提高了酚氧化酶原基因的表达,随着感染的进一步进行,病毒不断地复制,抑制了宿主的免疫系统,导致酚氧化酶原基因表达量下降。已知酚氧化酶原受一种丝氨酸蛋白酶的活化^[12],Roux等^[11]对虾的丝氨酸蛋白酶进行定量PCR分析表明,在监测的感染后32h中,其活性呈上升趋势,由此推测,感染后对虾体内的蛋白酶抑制物的表达水平可能上升。

到目前为止,还没有关于对虾感染WSSV后体内蛋白酶抑制物,特别是丝氨酸蛋白酶抑制物表达活性增高的报道。要验证这一设想,尚需进一步实验论证。在本研究的后续工作中,通过测序和比对分析,不但得到了WSSV的表达基因,而且还得到了螯虾体内的丝氨酸蛋白酶抑制物的基因表达量上升的结果(另文报道)。因此,本课题的开展为了解WSSV的表达基因图谱和甲壳动物的免疫调节机制打下基础。

参考文献:

- [1] Tsai C W, Chang S C, Chang M F. A 12-amino acid stretch in the hypervariable region of the spike protein S1 subunit is critical for cell fusion activity of mouse hepatitis virus[J]. J Bio Chem , 1999 , 274 : 26085 - 26090 .
- [2] Yang F, He J, Lin X H, et al. Complete genome sequence of the white spot bacilliform virus[J]. J Virol , 2001 , 75 (23) : 11811 - 11820 .
- [3] van Hulten M C W, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequenced[J]. Virology , 2001 , 286 : 7 - 22 .
- [4] 朱建中, 陆承平. 对虾白斑综合征病毒在螯虾动物模型的感染特性[J]. 水产学报 , 2001 , 25 (1) : 47 - 51 .
- [5] Thornqvist P O, Johansson M W, Söderhäll K. Opsonic activity of cell adhesion protein and beta-1, 3-glucan binding protein from two crustaceans[J]. Dev Comp Immunol , 1994 , 18 (1) : 3 - 12 .
- [6] Hall M, Wang R G, van Antwerpen R, et al. The crayfish plasma clotting protein: A vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood[J]. Proc Natl Acad Sci USA , 1999 , 96 : 1965 - 1970 .
- [7] 魏静, 陆承平, 黄捷, 等. 克氏原螯虾的血淋巴细胞原代培养[J]. 畜牧与兽医 , 1999 , 31 (5) : 11 - 12 .
- [8] 金冬雁, 黎孟枫(译). 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1996 .
- [9] van Hulten M C W, Westenberg M, Goodall S D, et al. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp[J]. Virology , 2000 , 266 : 227 - 236 .
- [10] van Hulten M C W, Witteveldt J, Snippe M, et al. White spot syndrome virus envelope protein VP28 is involved in the systemic infection of shrimp[J]. Virology , 2001 , 285 : 228 - 233 .
- [11] Roux M M, Pain A, Klimpel K R, et al. The lipopolysaccharide and β -1, 3-glucan bonding protein gene is upregulated in white spot virus - infected shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. J Virol , 2002 , 76 (14) : 7140 - 7149 .
- [12] Aspán A, Söderhäll K. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase[J]. Insect Biochem , 1991 , 21 : 363 - 373 .