

文章编号:1000-0615(2009)05-0856-09

## 三角帆蚌肝脏瘟病感染期抑制性消减 cDNA 文库的构建与分析

肖调义<sup>1</sup>, 葛熹凯<sup>1</sup>, 许宝红<sup>1</sup>, 苏建明<sup>1</sup>, 章怀云<sup>1,2</sup>

(1. 湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410128;

2. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410004)

**摘要:**采用抑制性消减杂交技术构建了三角帆蚌肝脏瘟病感染期抑制性消减 cDNA 文库。经检验,差异表达基因均被富集了  $2^{10}$  倍左右,证明构建的 cDNA 消减文库具有很强的消减效率。PCR 鉴定发现,在随机挑取的阳性克隆中,95% 的克隆均含有 0.2~1.0 kb 的插入片段,这些片段可能是三角帆蚌瘟病病毒感染后差异表达基因的 cDNA 片段。测序共获得 214 个有效 cDNA 序列,分别属于 8 大类,共 98 个基因。其中细胞分裂基因 2 个、细胞结构与运动基因 9 个、代谢基因 10 个、信号传导基因 7 个、细胞防疫基因 10 个、基因与蛋白表达基因 20 个、未知功能蛋白基因 26 个,GenBank 中找不到任何同源序列的基因 14 个。结果说明,构建的差异表达 cDNA 文库,可较好地反映三角帆蚌瘟病病毒对三角帆蚌影响的基因信息。

**关键词:**三角帆蚌;肝脏;三角帆蚌瘟病病毒;抑制性消减杂交;消减 cDNA 文库

**中图分类号:**Q 786;S 917

**文献标识码:**A

三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) 属软体动物门 (Mollusca) 瓣鳃纲 (Lamellibranchia) 真瓣鳃目 (Eulamellibranchia) 蚌科 (Unionidae) 帆蚌属 (*Hyriopsis*), 为中国特有淡水育珠双壳贝类<sup>[1]</sup>, 占淡水养殖珍珠蚌的 95% 以上<sup>[2]</sup>。近年来,由于三角帆蚌瘟病的频发给淡水珍珠产业造成了巨大损失,严重阻碍了珍珠产业的健康发展。

20 世纪 80 年代以来,针对三角帆蚌瘟病的病原、组织病理以及防治方法等方面开展了一系列的研究,但是三角帆蚌瘟病仍旧没有得到有效防治,而且关于三角帆蚌瘟病原有病毒<sup>[3-4]</sup>和细菌<sup>[5-6]</sup>两种说法。邵健忠等<sup>[8-9]</sup>对三角帆蚌瘟病病理学观察发现,肝脏、胃、肠道和直肠是病原侵害的主要的器官。本课题组研究表明,病毒为三角帆蚌瘟病的原发性病原,细菌是继发性病原;肝脏是该病最先发病的器官,也是受损最严重的器官<sup>[7]</sup>。肝脏作为三角帆蚌的主要免疫器官,在机体解毒、对外来微生物吞噬过程中均具有重要意义。但至今有关三角帆蚌肝脏在抵抗瘟病病毒

侵害过程中作用的研究还十分有限,肝脏免疫系统、免疫机制和免疫相关基因的报道也较少。

本研究利用抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH) 构建了瘟病病毒感染后三角帆蚌肝脏差异表达 cDNA 消减文库,并对获得的序列进行了生物信息学分析,结果为探讨三角帆蚌免疫机制以及抗病新品种的培育提供基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

取健康三角帆蚌 (购自常德) 置水族箱中暂养 7 d, 按文献 [10-11] 方法制备接种三角帆蚌瘟病病毒, 28 °C 饲养, 观察发病情况。8 d 开始有蚌病死现象, 至 2 周左右达到高峰。取 2 周末死个体的肝脏组织, 灭菌 DEPC 水清洗, 迅速分装放入液氮中冻存备用。

#### 1.2 方法

总 RNA 提取和 mRNA 分离 利用 TRIzol

收稿日期:2008-09-02 修回日期:2008-12-17

资助项目:湖南省科技厅攻关项目(06NK3049);湖南省教育厅重点项目(07A012)

通讯作者:章怀云, E-mail:hyzhang@public.cs.hn.cn

(Invitrogen)分离三角帆蚌诱导和未诱导肝脏组织总 RNA;使用 Oligotex<sup>TM</sup>-dT30 < super > mRNA Purification Kit (TaKaRa),分离 mRNA。紫外分光光度测定 RNA 浓度,甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析观察结果。

**抑制性消减杂交 (SSH)** 抑制性消减杂交采用 PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtraction Kit (Clontech)。以瘟病病毒感染组的肝脏作为消减杂交的实验方 (Testers),正常组的肝脏作为驱动方 (Driver)。Driver cDNA 的制备是将正常组肝脏组织 mRNA 逆转录合成双链 cDNA,然后用 *Rsa* I 充分酶切 3 h 后完成。Tester cDNA 的制备是将感染后未死组肝脏组织合成的双链 cDNA 用 *Rsa* I 酶切后,分成 2 份,分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 连接后即制成 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA。以制备好的肝脏 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别进行抑制性消减杂交。抑制消减杂交过程:首先将 Tester-1 cDNA 和 Tested-2 cDNA 分别与 Driver cDNA 进行第 1 次杂交,混合 2 种杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA 进行第 2 次杂交,杂交产物随后以引物 primer 1 (试剂盒提供)进行第 1 次 PCR 扩增,第 1 次 PCR 产物再用引物 Nested primer 1 和 2R (试剂盒提供)进行第 2 次 PCR 扩增,使特异于正常组肝脏组织差异表达的基因得到指数扩增。

**消减效率检测** 用鲍  *$\beta$ -actin* 特异的上游引物:5'-CACTGTGCCCATCTACGAG-3',下游引物:5'-CCATCTCCTGCTCGAAGTC-3',对消减后第 2 次 PCR 产物进行消减效率检测。同时,以未经抑制性消减杂交的 cDNA (在制备 Tester cDNA 连接 2 种接头时,将刚加好样还未进行连接反应的 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA 各取 2  $\mu$ L 混合,进行连接反应完成)作为对照进行 PCR。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C, 30 s;60  $^{\circ}$ C,30 s;72  $^{\circ}$ C,2 min,扩增 33 个循环,分别第 18,23,28,33 循环处取 5  $\mu$ L 进行电泳,以检测消减效率。

**抑制性消减 cDNA 文库的构建** 将第 2 次 PCR 的产物连接到载体 pUCm-T (Promega 公司),转化到 JM109 感受态细胞,将菌液均匀涂布于含 Amp 的 LB/X-gal/IPTG 培养基上,在生化培养箱中 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h,构建三角帆蚌肝脏正向 cDNA 消减文库。随机挑取白色菌落接种于 1

mL LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。用接头内侧序列引物 [M13 + :5'd(GTAAAACGACGGCC AGT)3',M13 - :5'd(AACAGCTATGACCATG)3']进行 PCR 扩增。反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C,30 s;54  $^{\circ}$ C,30 s;72  $^{\circ}$ C,1 min,扩增 25 个循环,取 5  $\mu$ L 反应液进行电泳,确定是否有片段插入以及插入片段大小和分布范围。

**差异表达片断测序及同源性分析** 随机挑选载有插入差异表达片段的阳性克隆 300 个测序,测序结果采用 DNAMAN 序列分析软件对原始序列进行修正与分析,利用 BlastN、BlastX 分别进行比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 完整性分析

紫外分光光度检测总 RNA OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 分别为 1.89 和 1.93,电泳检测发现,在 28S,18S 位置有 2 条完整、明显的带(图 1),表明 RNA 纯度较高,完整性好,符合建库要求。

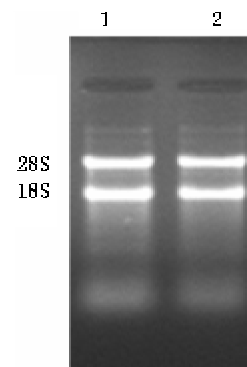


图 1 未诱导和诱导肝脏组织总 RNA

1. 未诱导肝脏组织总 RNA; 2. 诱导肝脏组织的总 RNA

Fig. 1 Total RNA isolated from virus and mock-infected liver

1. Total RNA isolated from mock-infected liver tissue; 2. Total RNA isolated from virus-infected liver tissue

### 2.2 接头连接效率检测

以 *Rsa* I 核酸内切酶将等量的来自诱导后未死三角帆蚌肝脏组织及正常三角帆蚌肝脏组织的 cDNA 消化成长度约为 0.1 ~ 2.0 kb 的片段,以利于后续的 adaptor 1, adaptor 2R 与其连接并进行后续的杂交,连接效率是 SSH 文库构建成败的重要因素。图 2 显示了检测 Tester-1 cDNA 和 Tester-2 cDNA 的接头连接效率的结果。2, 4 泳道用  *$\beta$ -actin* 的上游和下游引物做 PCR,1,3 泳道

用 adaptor 1 和 adaptor 2 R 共有序列的引物 PCR primer 1 以及  $\beta$ -actin 的下游引物进行扩增。如果连接成功,则 1, 3 泳道的 PCR 产物将大于 2, 4 泳道。由图 2 可见,1, 3 泳道产物明显大于 2, 4 泳道,结果表明, dscDNA 与接头的连接是成功的。

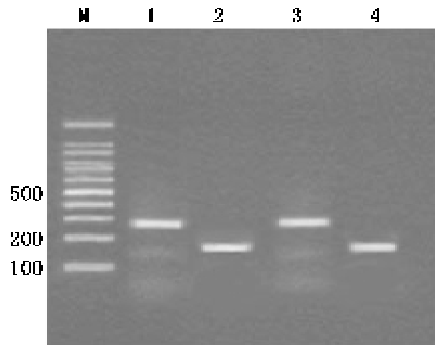


图 2 Tester cDNA 接头连接效率检测

M: 100 bp DNA marker. 1, 3:  $\beta$ -actin 上游引物和 adaptor 1 引物 PCR 扩增产物; 2, 4:  $\beta$ -actin 下游引物和 adaptor 2R 引物 PCR 扩增产物

Fig. 2 Detection of the adaptor ligation efficiency of tester cDNA.

M: 100 bp DNA marker; 1, 3: PCR products amplified by  $\beta$ -actin upriver primer and adaptor PCR primer 1; 2, 4: PCR products amplified by  $\beta$ -actin downriver and primer adaptor PCR primer 2R

### 2.3 三角帆蚌组织消减 cDNA 文库的建立

将制备的 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别进行 2 轮杂交和 2 轮 PCR 即完成三角帆蚌肝脏组织消减 cDNA 文库的构建。从文库 2 次 PCR 扩增可以看出, 2 轮 PCR 扩增后的杂交产物为一弥散的 cDNA 群体, 杂交产物主要集中在 200 ~ 1 000 bp 之间, 而且内含有几条较为清晰的条带 (图 3)。结果初步显示, 已经成功构建了肝脏消减 cDNA 文库。

### 2.4 消减杂交效率分析

用鲍  $\beta$ -actin 特异性引物分别扩增未消减和消减后的第 2 次 PCR 产物 (图 4)。结果显示, 相同 PCR 循环参数下, 对于未经消减杂交的 cDNA, 23 循环处即可见明显产物条带, 而经过消减杂交的 cDNA, 延迟 10 个循环后方可见 PCR 产物条带, 差异表达的基因均被富集了  $2^{10}$  倍左右, 表现出较高的消减杂交效率 (图 4)。

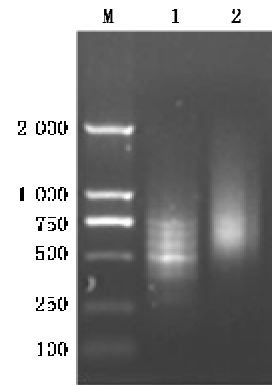


图 3 已消减和未经消减 cDNA 为模板的第 2 次 PCR 结果

M: D2000 DNA marker; 1: 以消减 cDNA 为模板; 2: 以未消减 cDNA 为模板

Fig. 3 The 2nd PCR products of subtracted and unsubtracted cDNA

M: D2000 DNA marker; 1: 2nd PCR products of subtracted; 2: 2nd PCR products of unsubtracted

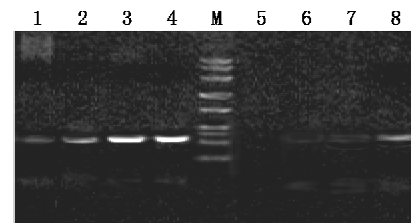


图 4 cDNA 文库的消减杂交效率的检测

M: 100bp DNA marker; 1~4: 未经消减的 cDNA 经 18, 23, 28 和 33 循环的 PCR 产物; 5~8: 经消减的 cDNA 经 18, 23, 28 和 33 循环的 PCR 产物

Fig. 4 Subtractin efficiency of subtracted cDNA library by detection

M: 100bp DNA marker. PCR analysis was performed on unsubtracted (lane 1-4) or subtracted (lane 5-8) secondary PCR products with the primer of  $\beta$ -actin, respectively. lane 1 and lane 5: 18 cycles; lane 2 and lane 6: 23 cycles; lane 3 and lane 7: 28 cycles; lane 4 and lane 8: 33 cycles

### 2.5 消减文库 cDNA 插入片断大小的检测

对随机挑取的 300 个阳性克隆用 M13 +/- 引物进行 PCR 检测发现, 有 214 个有效克隆, 插入片断长度主要集中在 0.2 ~ 1.0 kb, 与 PCR 消减结果基本相符 (图 5)。

### 2.6 消减 cDNA EST 序列统计与分析

序列分析结果表明, 所有测序的 300 个克隆中, 86 个克隆由于测序效果不佳或序列测序片段

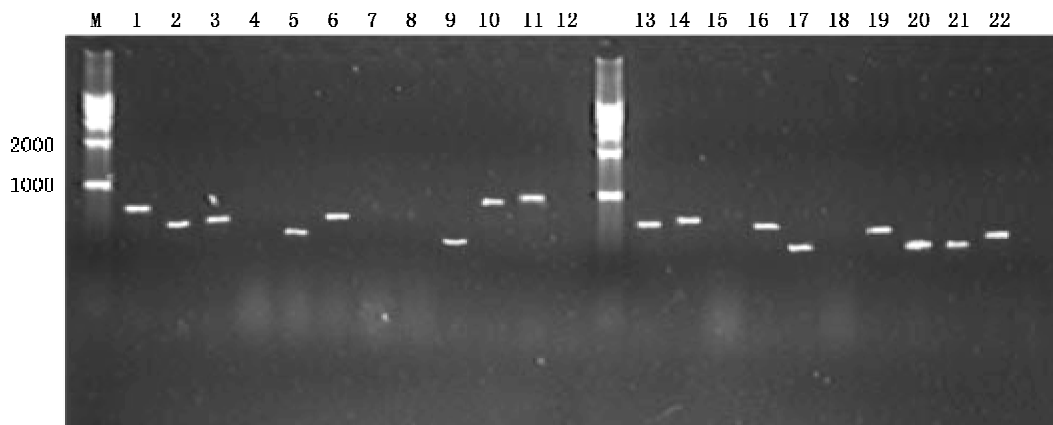


图 5 PCR 筛选消减文库中含 cDNA 片段的克隆

M: 1 kb DNA marker; 1 ~ 22: 插入片断的 PCR 产物

Fig. 5 Screen of colonies with cDNA fragments from subtractive cDNA library by PCR

M: 1 kb DNA marker; 1 ~ 22: PCR products of the inserted cDNA fragments

表 1 E 值分布范围

Tab. 1 Distribution range of E value

E 值范围	E-value range	< -60	-60 ~ -20	> -20
细胞分裂	cell division	0	1	1
细胞结构与功能	cell structure and motility	3	0	6
代谢	metabolism	0	3	7
信号传导	signal transduction	0	3	4
细胞防御	cell defense	1	1	8
基因与蛋白质表达	protein and gene expression	0	1	16
其它	miscellaneous	-	1	-
未知功能	unknown function	0	7	19

小于 150 bp 的原因没有得到相应的序列,实际共获得 214 个序列 (81.3%)。序列相似性分析表明,所获得的 214 个序列中,有 163 个克隆和 GenBank 中已知功能的序列具有同源性;30 个则与未知功能的开放阅读框具有较高相似性,称之为假定蛋白;21 个序列则没有任何相似的序列,很有可能是以前没有鉴定过的 EST 序列或是 5' 或 3'-UTR 序列。根据其编码的多肽功能,可以将这些 EST 分成 8 类<sup>[12]</sup>:细胞分裂、细胞结构和运动、代谢、信号传递、细胞防御、蛋白质和基因表达、其它 (未发现相似序列基因) 以及未知功能的假定蛋白 (表 2),共 98 个基因。分析发现代表这 98 个基因的 EST 序列,E 值范围主要集中在 > -20,占 74.1% (63/85) (表 1),其中 E 值 > -6 的又占 44.7% (38/85),表明在 GenBank 数据库中与本研究所得 EST 匹配的序列很少。这很有可能是由如下两方面原因造成的,一是 Genbank 中贝类的 EST 的序列信息很少,很难找

到与其同源性高的序列;二是消减所得 EST 为一些还没有被检测出来的新基因。

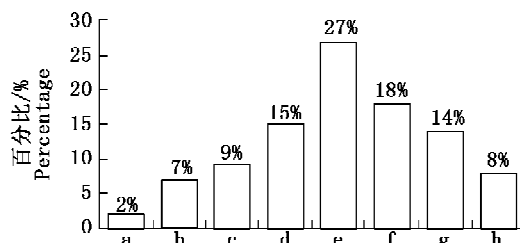


图 6 三角帆蚌 SSH EST 功能分类

a. 细胞分裂;b. 信号传导;c. 细胞结构与功能;d. 代谢; e. 未知功能;f. 基因与蛋白质表达;g. 其他;h. 细胞防御

Fig. 6 Function profile of *H. cumingii* SSH EST

a. cell division; b. signal transduction; c. cell structure and function; d. metabolism; e. unknown function; f. gene and protein expression; g. others; h. cell defense

### 3 讨论

抑制性差减杂交是寻找差异表达基因的有效方法之一,通过此方法,差异表达基因可以有效

表 2 与 GenBank 中编码已知功能蛋白质和假定蛋白质序列有同源性的三角帆蚌 EST

Tab. 2 *H. cumingii* ESTs matched to sequences encoding for known function protein and putative protein in GenBank database

GenBank 中最匹配序列 best GenBank match	长度 (bp) length	E 值 E-value	拷贝数 copies	
<b>细胞分裂 cell division</b>				
EX828680	putative senescence-associated protein	288	9.00E-28	1
EX828659	senescence-associated protein	608	2.00E-19	1
<b>细胞结构与功能 cell structure and motility</b>				
FE968648	LOC797832 protein	440	4.00E-04	2
FE968649	H02112.1	289	0.2	2
FE968650	TPA, transposase domain-containing protein	770	0.011	1
EX828669	putative peptidoglycan binding domain	811	6.00E-89	1
EX828665	conserved hypothetical protein	782	1.00E-04	1
EX828672	conserved hypothetical protein, secreted	532	0.037	14
EX828674	Beta-tubulin	424	3.00E-64	6
FE968657	apolipoporphin precursor	348	8.00E-06	1
EX828673	Tubulin, beta 4, isoform CRA_b	747	4.00E-64	2
<b>代谢 metabolism</b>				
FE968625	Alpha-amylase	478	6.00E-53	4
FE968624	Acrosin	266	3.00E-04	2
FE968627	Similar to PVAE354	445	1.00E-10	2
EX828661	Similar to Sialate O-acetyltransferase precursor	325	8.00E-04	12
FE968639	Similar to skeletrophin	745	4.00E-08	1
FE968643	Similar to NADH dehydrogenase	497	1.4	1
FE968654	Cathepsin L	538	1.00E-26	1
FE968647	Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase	346	6.5	1
EX828675	Peptidase, M23/M37 family	531	0.14	1
EX828670	Possible rubredoxin	896	3.00E-22	1
<b>信号传导 signal transduction</b>				
FE968637	Calcium-binding EGF domain containing protein	258	0.45	3
FE968626	AGAP009760 - PA	289	6.5	3
FE968638	TonB-dependent siderophore receptor	401	5	3
FE968632	ADP-ribosylation-like Factor 11	500	5.00E-47	1
FE968646	Unnamed protein product	653	2.00E-17	3
EX828667	NtrC family Transcriptional regulator	954	1.00E-60	1
EX828664	Sigma-54 factor, interaction region	918	3.00E-45	2
<b>细胞防御 cell defense</b>				
FE968641	Similar to arginase type 1	567	3.00E-23	1
FE968619	Transmembrane serine protease 9	524	3.00E-18	8
FE968655	Cytochrome P450 30	681	2.00E-52	1
FE968644	Similar to arginase	722	1.00E-65	1
EX828678	Trypsin	282	9.00E-19	2
EX828681	Trypsinogen RdoT3 precursor	280	9.00E-19	10
FE968623	Mucin 6, gastric	450	0.26	2
FE968622	Lysozyme	530	1.7	3
FE968618	Theromacin	823	3.00E-11	14
EX828677	Similar to PIT 54	774	2.00E-18	6
<b>基因与蛋白质表达 protein and gene expression</b>				
FE968628	Ribosomal protein S17	319	4.00E-18	1
FE968652	Pathogenic protein POP	433	8.3	1
FE968629	Ribosomal protein rp	261	5.00E-11	1
FE968656	Vdg3	353	4.00E-13	1
FE968631	PREDICTED: hypothetical protein	350	9.00E-13	1
FE968636	BCR/ABL fusion protein isoform Y5/X9/X3	417	4.00E-04	1
FE968653	Transcription regulator	221	6.5	1

· 续表 2 ·

	GenBank 中最匹配序列 best GenBank match	长度(bp) length	E 值 E-Value	拷贝数 copies
FE968620	GTOR	514	4.5	5
FE968621	Similar to suppression of tumorigenicity 14	795	5.00E-18	5
FE968633	GA13267-PA	724	0.25	1
FE968630	OSJNBb0013003.4	387	8.3	1
FE968634	AGAP012392-PA	344	0.002	3
FE968642	Similar to CG10130-PA	312	2.00E-08	1
FE968640	Similar to intrinsic factor	462	0.001	1
FE968645	Similar to conserved hypothetical protein	387	7.00E-10	1
EX828676	Similar to CG6050-PA	774	2.00E-18	11
EX828662	Thermobrachium celere 16S ribosomal RNA gene	325	8.00E-04	1
FE968651	Laminin receptor 1	311	2.00E-39	1
EX828660	Vdg3	376	1.00E-15	2
FE968635	PREDICTED: similar to dumpyp CG33196-PB	510	0.18	1
<b>其它 miscellaneous</b>				
EX828679	Unknown	439	6.00E-18	8
FE968680	No significant similarity found	430		1
FE968681	No significant similarity found	338		1
FE968682	No significant similarity found	777		1
FE968683	No significant similarity found	411		1
FE968684	No significant similarity found	209		1
FE968685	No significant similarity found	217		1
FE968686	No significant similarity found	427		1
FE968687	No significant similarity found	400		1
FE968688	No significant similarity found	550		1
FE968689	No significant similarity found	217		1
FE968690	No significant similarity found	354		1
FE968691	No significant similarity found	428		1
FE968692	No significant similarity found	347		1
<b>未知功能 unknown function</b>				
FE968658	Hypothetical protein plu4507	127	0.99	1
FE968659	Hypothetical protein	511	1.00E-17	1
FE968660	Hypothetical protein	522	4.00E-18	1
FE968661	Hypothetical protein	366	4.5	1
FE968662	Hypothetical protein	333	8.00E-08	3
FE968663	Hypothetical protein	418	1.00E-35	1
FE968664	Hypothetical protein 33	280	0.001	1
FE968665	Hypothetical protein PF11_0350	400	6.5	1
FE968666	Predicted protein	400	3.00E-28	1
FE968667	Hypothetical protein CAC1981	311	0.98	3
FE968668	Hypothetical protein	473	1.00E-18	1
FE968669	Hypothetical protein GSPATT00007496001	315	3.8	1
FE968670	Hypothetical protein TVAG_244490	531	1.7	1
FE968671	Hypothetical protein ANACOL_02563	393	6.5	1
FE968672	Hypothetical protein TVAG_417900	571	2.8	1
FE968673	Hypothetical protein RBTH_07743	286	8.5	1
FE968674	Hypothetical protein	419	5.00E-37	1
FE968675	Hypothetical protein	658	1.00E-26	1
FE968676	Hypothetical protein	486	1.00E-33	1
FE968677	Hypothetical protein Daci_2082	622	0.9	1
FE968678	Hypothetical protein	473	5.00E-19	1
FE968679	Hypothetical protein	370	4.00E-05	1
EX828663	Hypothetical protein BACOVA_04540	558	1.00E-23	1
EX828668	Hypothetical protein CKO_02541	952	7.00E-52	1
EX828666	Hypothetical protein M23134_05237	502	2.00E-11	1
EX828671	Hypothetical protein MS1484	925	3.00E-12	1

富集。同 Fujiki 等<sup>[13]</sup> 在鲤 (*Cyprinus Carpio*) 和 Sangrador 等<sup>[14]</sup> 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 中克隆出免疫调控相关基因相似,本研究首次采用抑制性消减杂交技术构建了人工感染瘟病病毒后未死三角帆蚌肝脏差异表达的 cDNA 消减文库。所构建的文库中差异表达基因均被富集了  $2^{10}$  倍左右,表现出较强的消减效率。

在获得的 58 个基因中,有 10 个与机体物质和能量代谢相关的。如与物质消化相关的基因 Alpha-amylase, acrosin, similar to Sialate O-acetylerase precursor, cathepsin L 等。其中, Alpha-amylase 属于糖苷水解酶家族,可将淀粉和其相关多糖最终水解成为葡萄糖<sup>[15-16]</sup>;与物质能量代谢有关的蛋白及酶基因 similar to NADH dehydrogenase, possible rubredoxin, peptidase, M23/M37 family 等。有研究表明<sup>[17]</sup>,机体在受到外来微生物的入侵后,代谢出现紊乱,肝糖原分解增强,脂肪分解加速,血糖升高,以适应在应急情况下对能量的需要。可见,大量代谢相关基因的产生,可能是三角帆蚌在受到瘟病病毒的入侵后,机体对能量需要的一种表现。

研究表明:当机体受到外来有害物质侵袭时,应激蛋白可促进机体免疫系统打开,对外来有害物质进行抑制,从而避免由于有害刺激而引起的细胞死亡<sup>[18-20]</sup>。本研究所构建的消减文库中鉴定出部分与细胞防御相关的基因,如,应激蛋白家族的成员 theromacin 和 similar to PIT 54。Theromacin 是一种带阳离子的抗菌肽,对细菌有很强的抑制作用,其表达由外源病菌的入侵而被激活<sup>[21]</sup>。PIT 54 蛋白是最先在红原鸡 (*G. gallus*) 中被发现的一种富含半胱氨酸的清扫夫受体。在鸡类和热带爪蟾中,PIT 54 是可以完全取代结合珠蛋白功能的急性期蛋白<sup>[22]</sup>。因此,通过激活应激蛋白基因,产生应激蛋白的方式可能是三角帆蚌受到瘟病病毒侵犯时所采用的抵制或减少病原对机体伤害的方式之一。

arginase, cytochrome P450 和 mucin 是重要的抗肿瘤因子。肿瘤的快速生长需要大量精氨酸,天然精氨酸酶可以通过将精氨酸水解成鸟氨酸和尿素方式抑制肿瘤生长<sup>[23-26]</sup>。cytochrome P450 作用于环磷酸胺后,可被活化成细胞毒活性物质,从而发挥抗肿瘤作用。同时, cytochrome P450 激活的异环磷酸胺能引起细胞死亡,这对癌症治疗

有重要意义<sup>[27]</sup>。mucin 是一种肿瘤相关抗原,能够诱导细胞毒 T 淋巴细胞杀伤活性的表位肽,使人粘蛋白 1 可变数目连续重复区 (MUC1 VNTR) 成为免疫治疗的潜在靶点<sup>[28-29]</sup>。本研究在构建的消减文库中克隆到一系列与抗肿瘤相关的基因,如, similar to arginase type I, similar to arginase, cytochrome P450 30, trypsinogen RdoT3 precursor, trypsin, mucin 等。可见三角帆蚌在受到瘟病病毒感染后,免疫系统也会大量的激活抗肿瘤相关基因,产生抗肿瘤活性蛋白,以避免肿瘤发生或降低肿瘤发生的概率。

总之,本研究通过三角帆蚌肝脏消减 cDNA 文库的构建以及对获得的部分差异表达基因的初步分析,使我们对三角帆蚌免疫相关基因有了深入的认识,为三角帆蚌免疫生理过程的分子生物学特性、疾病的防治和抗病新品种的培育提供了重要的信息基础。尽管如此,由于通过 SSH 方法克隆到的仅是基因片段,而非基因全长。因此,今后有必要进一步通过 RACE 或者其他方法获得基因全长,继而对三角帆蚌免疫相关基因的结构和功能进行全面分析。

#### 参考文献:

- [1] 刘凌云,郑光美.普通动物学[M].第三版.北京:高等教育出版社,1997:220-221.
- [2] 赵明森.我国淡水珍珠生产的现状及发展对策[J].科学养鱼,2003,(2):3-4.
- [3] 沈志荣.三角帆蚌疾病病因探讨[J].科技通报,1986,(2):37-30.
- [4] 张治国.三角帆蚌瘟病的研究 I.一种新的病毒病[J].微生物学报,1986,26(4):308-312.
- [5] 倪达书.三角帆蚌疾病的初步研究[J].淡水渔业,1982,(5):41-42.
- [6] 钱旭初,张治国,张克艰,等.育珠三角帆蚌大批死亡病因的探讨[J].淡水渔业,1984,(5):14-15.
- [7] 肖调义.三角帆蚌瘟病的病原病理及免疫相关因子筛选与表达分析[D].长沙:湖南农业大学,2007:1-101.
- [8] 邵健忠,项黎新.三角帆蚌十六种同功酶系统的表型及其在瘟病蚌中的病理变化[J].水产学报,1993,17(3):199-208.
- [9] 邵健忠,项黎新,李亚南,等.三角帆蚌瘟病的组织病理研究[J].水产学报,1995,19(1):1-7.
- [10] 殷震.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1985.

- [11] 张治国. 三角帆蚌瘟病的研究 II. 三角帆蚌瘟病的病原——一种嵌砂样病毒[J]. 微生物学报, 1987, 27(2): 116 - 120.
- [12] Bouchez D H. Functional genomics in plants [J]. Plant Physiology, 1998, 118: 725 - 732.
- [13] Fujiki K, Bayne C J, Shin D H, *et al.* Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) C-type lectin and pentraxin by use of suppression subtractive hybridization [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2001, 11(3): 275 - 279.
- [14] Sangrador V A, Lennington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization [J]. Cytokine, 2002, 17(2): 66 - 70.
- [15] Macgregor E A, Janecek S, Svensson B. Relationship of sequence and structure to specificity in the  $\alpha$ -amylase family of enzymes [J]. Biochem Biophys Acta, 2001, 1546: 1 - 20.
- [16] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases [J]. Curr Opin Struct Biol, 1997, 7: 637 - 644.
- [17] 洪磊, 张秀梅. 环境胁迫对鱼类生理机能的影响 [J]. 海洋科学进展, 2004, 22(1): 114 - 121.
- [18] Gabai V L, Meriin A B, Grosser D D, *et al.* Hsp70 prevents activation of stress kinase; a novel pathway of cellular thermotolerance [J]. Biol Chem, 1997, 272(29): 18033 - 18037.
- [19] Kiang J G, Tsokos G C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology [J]. Phaf Macol Tlmr, 1998, 80(2): 183 - 201.
- [20] Samali A, Cotter T G. Heat shock proteins increase resistance to apoptosis [J]. Exp Cell Res, 1996, 223(1): 163 - 170.
- [21] Tasiemski A. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatum* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(30): 30973 - 30982.
- [22] Wicher K B, Fries E. Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken [J]. PNAS, 2006; 103: 4168 - 4173.
- [23] Vrat V. Inhibitory effects of arginase on mammary carcinoma transplants in strain "A" mice [J]. Permanente Found Med Bull, 1951, 9: 56 - 59.
- [24] Wiswell O B. Effects of intraperitoneally injected arginase on growth of mammary carcinoma implants in mice [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1951, 76: 588 - 589.
- [25] Irons W Q, Boyd E F. Arginase as anticarcinogenic agent in mice and human beings [J]. Ariz Med, 1952, 9: 39 - 43.
- [26] Bach S J, Lasnitzki I. Some aspects of the role of arginine and arginase in mouse carcinoma [J]. Enzymologia, 1947, 12: 198 - 205.
- [27] Arle P, Renner M, Salmons B, *et al.* Necrotic, rather than apoptotic, cell death caused by cytochrome P450-activated ifosfamide [J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(3): 220 - 230.
- [28] Macelean G, Miles D. Enhancing the effect of theratope STn-KLH cancer vaccine patients with metastatic breast cancer by pretreatment with low-dose intravenous cyclophosphamide [J]. J Immunother, 1996, 19: 309.
- [29] Kontani K, Taguchi O, Ozaki Y, *et al.* Recombinant MUC1 vaccinia virus: a potential vector for immunotherapy [J]. Cancer Gene Ther, 2002, 9(4): 330.



## Construction and analysis of subtracted cDNA library by suppression subtractive hybridization from *Hyriopsis cumingii* liver

XIAO Tiao-yi<sup>1</sup>, GE Xi-kai<sup>1</sup>, XU Bao-hong<sup>1</sup>, SU Jian-ming<sup>1</sup>, ZHANG Huai-yun<sup>1,2</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

**Abstract:** This study used suppression subtractive hybridization (SSH) for construction of the cDNA subtractive library of the liver from the living body infected *Hyriopsis cumingii* plague virus. After testing, differentially expressed genes were enriched in the 2<sup>10</sup> times that the proof of the cDNA library has strong subtractive efficiency. Three hundred positive clones were randomly picked and identified by PCR method; 95% clones contained 0.2 – 1.0 kb by inserts, which might be the cDNA fragment of differentially expressed genes in *Hyriopsis cumingii* plague virus infected group. Three hundred clones were sequenced and obtained 214 known function EST for 58 different genes were reported in *H. cumingii* for the first time in this study. According to the classification of functional genes by Adam, the identified EST in *H. cumingii* fell into eight categories relevant to 2 belong to cell division genes, 9 belong to cellular structure and movement genes, 10 belong to metabolism genes, 7 belong to signal transduction genes, 10 belong to cell immune-action genes, 20 belong to gene and protein expression associates genes and 26 belong to other proteins with unknown functions. In addition, there are 14 no similar sequence in Genbank, conjecturing its new genes. Results show, the method to construct cDNA subtractive library could well reflect the gene information of abalone affected by *H. cumingii* plague virus. Results of the present study provide the basic data to research of relationship between resistance breeding and gene expression of liver.

**Key words:** *Hyriopsis cumingii*; liver; *Hyriopsis cumingii* plague virus; suppression subtractive hybridization; subtracted cDNA library