

溶藻弧菌诱导马氏珠母贝血淋巴 cDNA 差减文库的构建及分析

王忠良^{1,2}, 简纪常^{1,3}, 鲁义善^{1,3}, 王蓓^{1,3}, 陈刚^{1,2}, 吴灶和^{3,4*}

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088;

2. 广东海洋大学南海水产经济动物增养殖重点实验室, 广东 湛江 524088;

3. 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室, 广东 湛江 524088;

4. 仲恺农业工程学院, 广东 广州 510225)

摘要: 为了探讨马氏珠母贝免疫防御机制, 筛选免疫防御相关功能基因, 以致病性溶藻弧菌人工感染的马氏珠母贝血淋巴为材料, 采用抑制性差减杂交 (SSH) 技术, 构建了溶藻弧菌诱导的马氏珠母贝血淋巴 cDNA 差减文库; 以马氏珠母贝管家基因 β -actin 作为差减指标检测该文库的差减效率; 对选取的 600 个阳性克隆进行测序及生物信息学分析。结果显示, 该文库的差减效率可达 2^{10} 倍; PCR 阳性检测显示差减片段为 100 ~ 750 bp, 对随机挑取 600 个克隆的测序结果显示, 共获得 414 个有效 EST 序列; 通过 BLAST 同源性比对, 有 167 个 EST 序列 (占 40.34%) 与 NCBI 数据库中已知功能蛋白质具较高同源性, 其中 7 个 EST 序列 (占 1.69%) 与免疫防御相关基因同源; 此外, 204 个 EST (占 49.28%) 在数据库中未发现同源序列。研究表明, SSH 技术能有效富集马氏珠母贝血淋巴差异表达基因, 研究结果为探索马氏珠母贝免疫基因作用机理和调控机制奠定了基础。

关键词: 马氏珠母贝; 溶藻弧菌; 抑制性消减杂交; cDNA 文库

中图分类号: Q 785; S 968.3

文献标志码: A

马氏珠母贝 (*Pinctada fucata*) 是我国南方培育海水珍珠的主要贝类, 在我国海水养殖业中占有重要地位, 但随着养殖规模的扩大和养殖历史的延长, 病害问题也日趋严重, 导致海水珍珠产量和质量的显著下降, 严重地威胁了我国海水珍珠产业的健康持续发展^[1]。然而, 有关马氏珠母贝免疫防御机制, 特别是分子免疫防御机制和免疫相关功能基因的研究还处于初级阶段。因此, 探讨马氏珠母贝分子免疫防御机制、筛选参与免疫防御调控相关的功能基因对于揭示马氏珠母贝免疫抗病机制、提高机体抗病力、实现遗传改良十分必要。

近年来, 以 PCR 为基础发展而来的抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization,

SSH) 技术使快速、灵敏地分离和筛选机体差异表达基因成为可能, 并已成功应用于筛选和鉴定贝类的差异表达基因。Gestal 等^[2] 利用 SSH 技术分析了文蛤 (*Ruditapes decussatus*) 在细菌感染前后血淋巴中基因表达的差异, 分离到 253 个差异表达的功能基因, 其中 3.16% 为免疫相关功能基因, 这些功能基因的获得, 以及随后的表达分析, 为探讨文蛤免疫防御机制提供了基因功能水平的参考; Wang 等^[3] 构建了细菌感染杂色鲍 (*Haliotis diversicolor*) 后的血淋巴 SSH 差减文库, 并从文库中得到 111 个差异表达基因, 荧光定量分析表明, 34 个基因的表达上调; Prado-Alvarez 等^[4] 构建了派金虫 (*Perkinsus olseni*) 诱导的文蛤血淋巴和鳃组织的差减文库, 获得了 305 个差异表达基

收稿日期: 2013-06-06 修回日期: 2013-11-12

资助项目: 国家自然科学基金项目 (31202023)

通信作者: 吴灶和, E-mail: wuzaohe@163.com

因。这些研究结果的获得为进一步认识贝类对外界微生物侵染的免疫应答机制奠定了基础。

本研究应用 SSH 技术构建了溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 诱导的马氏珠母贝血淋巴 cDNA 差减文库,并通过 EST 测序,结合生物信息学技术,对从文库中筛选到的差异表达基因进行了细致的分类研究,为进一步克隆马氏珠母贝相关功能基因及研究溶藻弧菌感染后相关功能基因的组织表达差异提供背景资料。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验中使用的溶藻弧菌及大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 菌株均为广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室保存;马氏珠母贝(平均壳长 70 mm)购自广东省湛江市徐闻迈陈珍珠贝养殖场,暂养于室内玻璃钢水槽中(50 cm \times 60 cm \times 70 cm),分为 2 组(检测组 tester 和驱动组 driver),每组 40 只;水温 25 $^{\circ}$ C,盐度 28,连续充气;暂养过程中以螺旋藻粉为饵料投喂,每天换水(100%)1 次;室内暂养 1 周后进行实验;Trizol reagent 购自 Invitrogen 公司;PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems III 试剂盒购自 Promega 公司;PCR-Select[™] cDNA Subtractive Kit 购自 CLONTECH 公司;QIAquick[™] PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司。

1.2 主要溶液及器皿的预处理

实验涉及 RNA 操作所需要的试剂均为经 0.1% DEPC 过夜处理或用 DEPC 处理水配制,根据需要进行高温高压灭菌处理;配制试剂所用的玻璃容器使用前均经 200 $^{\circ}$ C,4 h 以上烘烤处理;实验中所用的离心管、吸头等均用 0.1% DEPC 水浸泡过夜,并经高温高压处理后使用。

1.3 细菌复壮及人工感染

取 -80 $^{\circ}$ C 保存的溶藻弧菌菌株,平板划线后 28 $^{\circ}$ C 培养 18 h,挑取单菌落转移至 100 mL TSB (2% NaCl)培养基中,28 $^{\circ}$ C 振荡(120 r/min)培养 18 h,5 500 \times g 离心 5 min 收集菌体,沉淀用 PBS 缓冲液悬浮,紫外分光光度计测定 OD₆₀₀,确定感染浓度为 5.0 \times 10⁷ cfu/mL。

用 1 mL 无菌注射器,在 tester 组马氏珠母贝闭壳肌注射 0.1 mL 上述浓度溶藻弧菌菌液,同时 driver 组注射 0.1 mL PBS 缓冲液。

1.4 马氏珠母贝血淋巴采集

溶藻弧菌感染 8 h 后,用 1 mL 的无菌注射器在马氏珠母贝闭壳肌处采集血淋巴,每只 0.5 mL;采集的血淋巴分装至 1.5 mL 离心管中,每管 1 mL;4 $^{\circ}$ C,800 \times g 离心 10 min 收集血细胞;加入 1 mL Trizol 试剂,移液器反复抽吸使血细胞充分裂解后于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.5 总 RNA 提取及 mRNA 纯化

采用 Trizol (Invitrogen) 试剂提取血淋巴总 RNA,并用生物素标记的寡聚(dT)探针和链亲合素包裹的磁珠纯化(PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems III)mRNA,具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.6 SSH 差减文库的构建

使用 PCR-Select[™] cDNA Subtractive Kit 试剂盒进行差减文库的构建,操作方法参照试剂盒说明书(略改动)。本实验以溶藻弧菌感染的马氏珠母贝为 tester 组,以注射 PBS 缓冲液的马氏珠母贝为 driver 组,构建正向差减文库。

首先分别制备血淋巴组织 driver 组和 tester 组的双链 cDNA,然后将 tester 和 driver 组 cDNA 采用 *Rsa* I 进行酶切,37 $^{\circ}$ C 温育过夜;tester 组 cDNA 经 *Rsa* I 酶切后分成 2 份,分别于接头 1,接头 2R 连接制成 tester 1-1 和 tester 1-2;经过接头连接效率检测步骤后,可将连上接头的 driver cDNA 和 tester cDNA 进行抑制性差减杂交。将 tester 1-1 cDNA 和 tester 1-2 cDNA 分别与 driver cDNA 在 68 $^{\circ}$ C 条件下反应 10 h 以第一次杂交;将变性的 driver cDNA 同时与首轮杂交样品 tester 1-1、tester 1-2 充分混合,68 $^{\circ}$ C 杂交过夜完成第二次杂交;采用接头外侧相同序列引物,在热启动酶的参与下进行第一次 PCR 扩增,为了进一步降低背景,使用接头内侧共有序列引物进行第二次 PCR 扩增。PCR 产物采用 QIAquick PCR purification kit PCR 产物纯化试剂盒进行纯化以供后续使用。

1.7 接头连接效率与差减效率检测

接头连接效率与差减效率检测均以马氏珠母贝 β -actin 基因为标准。以 β -actin 基因 5'端引物(5'-GTTGGTATGGGACAGAAG-3')和 3'端引物(5'-TGTGGTGGTGAATGAGTA-3')为一个组合,以试剂盒提供的接头引物 PCR primer1 和 β -actin 的下游引物为一个组合进行 PCR 扩增,比较

不同引物组合扩增效果,鉴定连接效率。反应条件:75 °C 5 min,94 °C 2 min,然后 94 °C 30 s,62 °C 30 s,72 °C 40 s 扩增 30 个循环。以管家基因 β -actin 作为检测差减 cDNA 文库差减效率的指标,PCR 反应条件除不需 75 °C 5 min 之外,其余参数均同上述条件。

1.8 差减 cDNA 文库的构建及阳性克隆鉴定

将上述制备的 PCR 产物连接到 pMD18-T 载体 (TaKaRa),转化连接产物入大肠杆菌 DH5 α 中,涂布于含氨苄青霉素的琼脂平板上,37 °C 倒置培养过夜,随机挑选若干单菌落,37 °C 振荡培养 3 h,使用巢式 PCR 引物 1 和巢式 PCR 引物 2R 进行 PCR 以鉴定阳性克隆,PCR 循环参数为:94 °C 预变性 5 min,94 °C 30 s,68 °C 45 s,72 °C 2 min 共 30 个循环。将鉴定正确的 600 个阳性克隆委托华大(深圳)基因科技有限公司进行测序。

1.9 生物信息学分析

利用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 工具扫描测序所得的全部 ESTs 序列,并去除其中载体序列;使用 DNAMAN5.2.2 软件对全部有效的 ESTs 序列进行聚类拼接,生成拼接而成的 Contigs 和未参与拼接的 Singletons。使用 BLASTx 工具 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对获得的 Contigs 和 Singletons 与 GenBank 数据库 (Non-redundant protein sequences database) 进行同源性比较,并根据相似性序列的功能对 ESTs 序列做功能分类。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 质量鉴定

TRIzol 试剂分别提取 tester 组和 driver 组马氏珠母贝血细胞的总 RNA。经紫外分光光度计检测,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分别为 1.90 和 1.96,说明总 RNA 纯度较好;图 1 为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳结果,条带以 18S 为主,未见弥散现象,完整性较好,可用于后续 mRNA 的纯化。

2.2 mRNA 的纯化

经 PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems III 试剂盒纯化的 mRNA 1.0% 琼脂糖凝胶电泳图呈弥散状(图 2),大小分布均匀,且未见核糖体 RNA 污染。紫外分光光度计测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值分别为 1.89 和 1.90,可以用于后续 cDNA 双

链的合成。

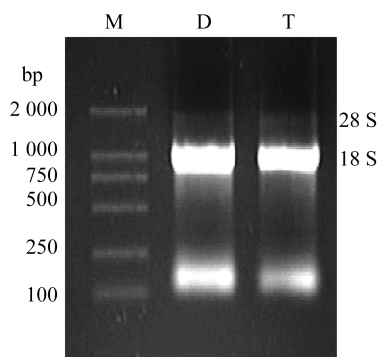


图 1 马氏珠母贝血细胞总 RNA 琼脂糖凝胶电泳
M. DL2000 分子标准; D. 驱动组; T. 检测组

Fig. 1 Agarose electropherogram of total RNA purified from hematocytes of *P. fucata*

M. DL2000 marker; D. driver; T. tester

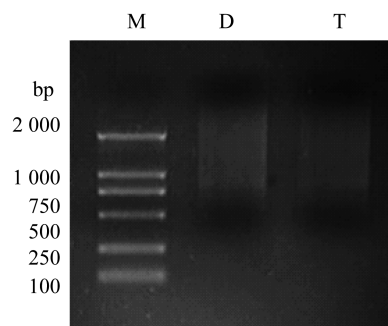


图 2 纯化 mRNA 琼脂糖凝胶电泳

M. DL2000 分子标准; D. 驱动组; T. 检测组

Fig. 2 Agarose electropherogram of purified mRNA from hematocytes of *P. fucata*

M. DL2000 marker; D. driver; T. tester

2.3 双链 cDNA 的合成及 *Rsa* I 酶切

分别取 6 μ L 酶切前的 driver cDNA 和 tester cDNA 以及 1 μ L 酶切后的 driver cDNA 和 tester cDNA 进行琼脂糖凝胶电泳分析,如图 3,cDNA 条带均呈弥散状,酶切后的 cDNA 条带大小较酶切前明显减小,表明酶切效果良好。

2.4 接头连接效率的检测

采用 SSH 技术构建差减文库成功与否与接头效率的高低有直接的联系。扩增连接接头之后的正、负向 DNA,30 个循环后可扩增出 PCR 产物(图 4),表明连接效率较高,超过 50%,已成功制备了 tester cDNA,可用于下一步的杂交和 PCR 扩增实验。

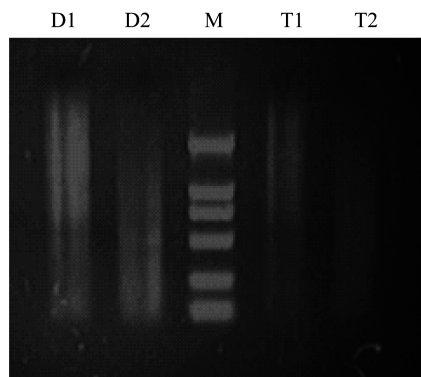


图3 *Rsa* I 酶切前后双链 cDNA 条带大小对比

M. DL2000 分子标准; D1. 酶切前 driver cDNA; D2. 酶切后 driver cDNA; T1. 酶切前 tester cDNA; T2. 酶切后 tester cDNA

Fig.3 Driver and Tester ds cDNA before and after *Rsa* I digestion

M. DL2000 marker; D1. driver cDNA before digestion; D2. driver cDNA after digestion; T1. tester cDNA before digestion; T2. tester cDNA after digestion

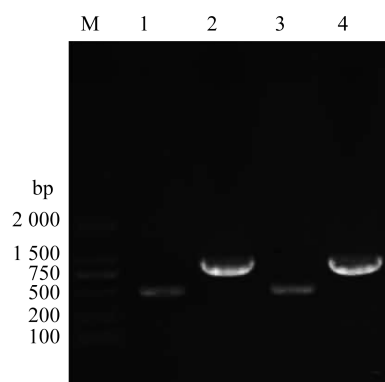


图4 Tester cDNA 接头的连接效率检测

M. DNA 分子量标准 DL2000; 1 和 3. 以 β -actin 的上游和下游引物进行扩增的 PCR 产物; 2 和 4. 以 PCR primer 1 和 β -actin 的下游引物进行扩增的 PCR 产物

Fig.4 Detection of the adaptor ligation efficiency of tester cDNA

M. DNA marker DL2000; Lanes 1 and 3. PCR products amplified by β -actin upstream and downstream primer; Lanes 2 and 4. PCR products amplified by adapter primer PCR primer 1 and β -actin downstream primer

2.5 cDNA 文库差减效率检测

以差减后的 cDNA 为模板检测管家基因 β -actin, 在循环数至 30 个循环时才有扩增带出现, 而以未差减的 cDNA 为模板扩增该产物时, 在 20 个循环数时即可检测到扩增产物, 表明构建的差减文库效率非常高, 可达到近 2^{10} 倍(图 5)。

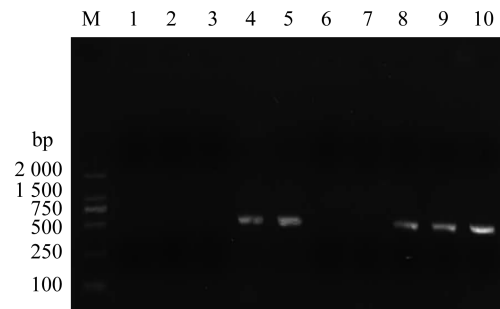


图5 以 β -actin 为指标检测差减文库的差减效率

M. DNA 分子量标准 DL2000; 1~5. 以差减 cDNA 为模板分别在 15, 20, 25, 30, 35 个循环的 PCR 产物; 6~10. 以未差减 cDNA 为模板分别在 15, 20, 25, 30, 35 个循环的 PCR 产物

Fig.5 Subtraction efficiency of subtracted cDNA library by detection of β -actin gene

M. DNA marker DL2000; 1-5. PCR products of unsubtracted cDNA in 15, 20, 25, 30 and 35 cycles, respectively; 6-10. PCR products of subtracted cDNA in 15, 20, 25, 30 and 35 cycles, respectively

2.6 杂交产物的 PCR 扩增

经 2 轮消减杂交以后, 只有被连接上 2 种不同接头的双链 cDNA 分子能通过 PCR 指数扩增。利用引物 PCR primer 1 以及巢式引物 nested PCR primer 1 和 nested PCR primer 2R 分别对杂交产物进行 PCR 扩增, 巢式 PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示杂交产物的 PCR 扩增条带呈弥散状, 片段大小集中在 250 ~ 500 bp (图 6)。

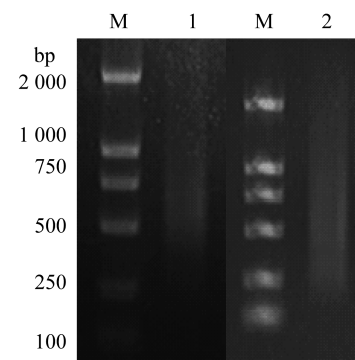


图6 杂交产物次轮 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

M. DL2000 分子标准; 1, 2. PCR 产物

Fig.6 Secondary PCR products of hybridization products

M. DL2000 marker; 1, 2. PCR products

2.7 阳性克隆的 PCR 鉴定

随机选择 800 个克隆, 利用巢式引物 nested

PCR primer 1 和 nested PCR primer 2R 进行 PCR 扩增, 鉴定阳性克隆。电泳结果显示插入片段大小介于 100 ~ 750 bp, 得到 600 个阳性克隆子(图 7)。

2.8 ESTs 生物信息学分析及功能分类

将以上筛选到的 600 个阳性克隆子扩大培养后送深圳华大基因科技有限公司测序, 成功进行 505 个测序反应, 共获得有效 ESTs 414 个。BLASTx 同源性分析表明, 210 个 ESTs 序列(包含 116 个 contigs)与 NCBI 非冗余蛋白质数据库中的蛋白质序列存在显著的相似性, 其中 167 个 ESTs 序列(72 个 contigs)与已知功能蛋白质序列具高度同源性。

根据 BLASTx 同源性分析得到的相似性序列的功能可将获得的 ESTs 分为以下 9 类(表 1 和表 2):

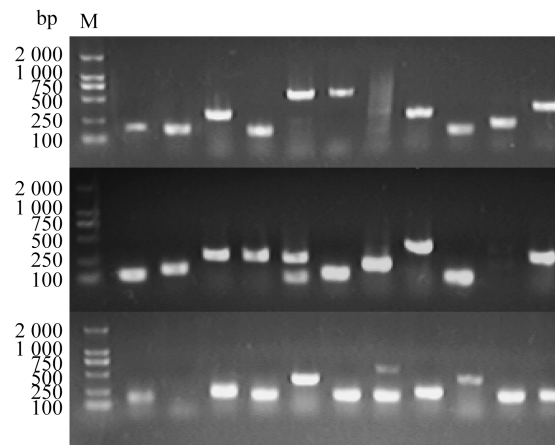


图 7 部分克隆的 PCR 鉴定

M. DL2000 分子标准

Fig. 7 Identification of partial positive clones by PCR

M. DL2000

表 1 溶藻弧菌诱导的马氏珠母贝血淋巴差减文库中分离的 ESTs

Tab. 1 ESTs isolated from the haemocytes subtractive library of *P. fucata* challenged with *V. alginolyticus*

EST 类别 category and gene identity. BLASTx	同源物种 homolog species	e 值 e-value	克隆/重叠群数 no. of clones/no. of contigs
cell immunity/defense/stress			
galectin	<i>Haliotis discus hannai</i>	8.00E-28	1/1
heat shock protein 70	<i>Pteria penguin</i>	2.00E-60	1/1
alpha 2 macroglobulin	<i>Chlamys farreri</i>	9.00E-03	1/1
ferritin protein	<i>Pinctada fucata</i>	4.00E-18	2/1
defense protein	<i>Lonomia obliqua</i>	5.90E-02	2/1
cytoskeleton			
galaxin	<i>Montipora capitata</i>	7.00E-11	1/1
actin	<i>Pinctada fucata</i>	8.00E-127	14/3
alpha-tubulin	<i>Crassostrea gigas</i>	1.00E-76	3/1
beta-tubulin	<i>P. vulgata</i>	3.00E-34	4/1
matrilin-3	<i>Bos taurus</i>	4.00E-08	3/1
coronin	<i>Nasonia vitripennis</i>	8.00E-04	3/1
ribosomal proteins			
ribosomal protein L3	<i>Chlamys farreri</i>	4.00E-83	1/1
ribosomal protein L17	<i>Phoronis muelleri</i>	1.00E-43	7/1
ribosomal protein L21	<i>Phoronis muelleri</i>	6.00E-05	2/1
ribosomal protein L28	<i>Novocrania anomala</i>	5.00E-19	3/1
ribosomal protein L30	<i>Spodoptera frugiperda</i>	9.00E-19	1/1
ribosomal protein L31	<i>Crassostrea gigas</i>	6.00E-14	1/1
ribosomal protein L32	<i>P. vanderplanki</i>	3.00E-19	2/1
ribosomal protein L36a	<i>Lineus viridis</i>	3.00E-08	1/1
ribosomal protein L40	<i>Crassostrea gigas</i>	2.00E-51	6/2
ribosomal protein S15	<i>Lineus viridis</i>	8.00E-28	1/1
ribosomal protein S20	<i>Eurythoe complanata</i>	5.00E-34	2/1
ribosomal protein S24	<i>Sipunculus nudus</i>	9.00E-39	1/1
ribosomal protein S28	<i>B. belcheri tsingtaunese</i>	3.00E-07	1/1

续表 1

EST 类别 category and gene identity. BLASTx	同源物种 homolog species	e 值 e-value	克隆/重叠群数 no. of clones/no. of contigs
cell metabolism/respiratory chain			
Acyl-CoA synthetase long-chain family	<i>Danio rerio</i>	1.00E-17	1/1
5-aminolevulinic synthase	<i>Crassostrea gigas</i>	1.00E-62	2/1
translationally-controlled tumor protein	<i>S. cerevisiae</i>	3.40E-02	1/1
MAWD binding protein-like	<i>Danio rerio</i>	5.00E-07	2/1
HRAS-like suppressor 2	<i>Pan troglodytes</i>	5.00E-10	3/1
receptor of Activated Kinase C	<i>Mya arenaria</i>	5.00E-22	1/1
Fructose-1,6-bisphosphatase	<i>Laccaria bicolor S238N-H82</i>	4.00E-17	2/1
Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Pinctada fucata</i>	2.00E-148	1/1
Cytochrome c oxidase subunit 3	<i>Saprolegnia ferax</i>	5.00E-31	1/1
Cytochrome b	<i>L. whiffiagonis</i>	1.00E-06	2/1
Mitochondrial H + ATPase alpha-subunit	<i>Pinctada fucata</i>	8.00E-101	4/1
short-chain dehydrogenase	<i>Aedes aegypti</i>	1.00E-16	1/1
cell signaling/adhering			
phospholipase C	<i>Aplysia californica</i>	8.00E-39	2/1
zona pellucida glycoprotein	<i>Rattus norvegicus</i>	1.00E-04	3/1
tumor suppressor QM protein	<i>Pinctada martensi</i>	4.00E-43	5/1
thrombospondin 4	<i>Homo sapiens</i>	2.80E-01	1/1
hillarin	<i>Hirudo medicinalis</i>	1.00E-16	1/1
transmembrane protein 8	<i>Monodelphis domestica</i>	2.00E-06	1/1
cell cycle/DNA replication/protein regulation/transcription/translation			
cell division cycle protein 42	<i>Sitobion avenae</i>	1.00E-54	1/1
cathepsin L	<i>Hydra vulgaris</i>	6.00E-26	2/1
ubiquitin	<i>Gallus gallus</i>	8.00E-56	10/3
histone H2 A	<i>S. purpuratus</i>	1.00E-58	1/1
mutS homolog 3	<i>Equus caballus</i>	4.40E-02	3/1
methyltransferase 11 domain	<i>Equus caballus</i>	7.00E-05	1/1
translation elongation factor 1B gamma subunit	<i>S. purpuratus</i>	3.40E-02	1/1
elongation factor-1-alpha	<i>Cerebratulus lacteus</i>	1.00E-18	3/1
mitochondrial gene for 16S rRNA	<i>Pinctada fucata</i>	0.00E-00	7/1
astacin-like protein	<i>Pinctada fucata</i>	4.00E-50	12/2
kruppel-like factor	<i>Haliotis diversicolor</i>	4.00E-32	2/1
elongation factor-2	<i>M. giganteus</i>	3.00E-16	1/1
nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	<i>Danio rerio</i>	2.00E-30	2/1
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	6.00E-10	1/1
nuclear receptor coactivator 4	<i>O. anatinus</i>	1.00E-34	1/1
translation initiation factor 4A	<i>Danio rerio</i>	4.00E-24	3/1
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	<i>Limulus polyphemus</i>	6.00E-17	1/1
proteasome beta 3 subunit	<i>Nasonia vitripennis</i>	2.00E-19	2/1
U2 snRNP auxiliary factor small subunit	<i>Monodelphis domestica</i>	2.00E-16	2/1
poly A binding protein	<i>Tribolium castaneum</i>	2.00E-06	2/1
transfer proteins			
dynein heavy chain isotype 1	<i>T. gratilla</i>	7.00E-44	4/1
solute carrier family 25	<i>Homo sapiens</i>	4.00E-24	4/1
clathrin	<i>Xenopus tropicalis</i>	3.40E-01	2/1
glycine transporter	<i>S. purpuratus</i>	1.00E-18	1/1

注: e 值 $\leq 10 e^{-3}$ 认为比对结果显著

Notes: Only matches with e-values $\leq 10 e^{-3}$ were retained as significant

表2 马氏珠母贝血淋巴差减文库 ESTs 统计分析
Tab.2 General characteristic of ESTs obtained from haemocytes of *P. fucata* challenged with *V. alginolyticus*

类别 category	总 ESTs total ESTs
测序 EST 总数 total EST sequenced	505
分析 EST 总数 total EST analyzed	414
具同源性 EST total EST with significant matches	210
无显著同源性 EST no significant match to database	204

(1) 免疫防御应激蛋白(5 个 clone clusters, 7 个 ESTs, 占 1.69%);

(2) 细胞骨架相关蛋白(8 个 clone clusters, 28 个 ESTs, 占 6.76%);

(3) 核糖体蛋白(14 个 clone clusters, 29 个 ESTs, 占 7%);

(4) 细胞代谢/呼吸链相关蛋白(12 个 clone clusters, 21 个 ESTs, 占 5.07%);

(5) 细胞信号转导/粘附相关蛋白(6 个 clone clusters, 13 个 ESTs, 占 3.14%);

(6) 细胞周期/DNA 复制/蛋白调控/转录/翻译相关蛋白(23 个 clone clusters, 58 个 ESTs, 占 14%);

(7) 转运相关蛋白(4 个 clone clusters, 11 个 ESTs, 占 2.66%);

(8) 未知功能蛋白(43 个 ESTs, 占 10.39%);

(9) 与数据库中序列无显著同源性 ESTs (204 个 ESTs, 占 49.28%)。

3 讨论

马氏珠母贝作为我国海水珍珠养殖的主要母贝,其养殖现状已经受到越来越多的关注。马氏珠母贝病害问题的日趋严重,导致海水珍珠产量和质量的显著下降,极大地制约了我国海水珍珠产业的健康持续发展。为解决这一问题,目前已经做了很多研究,但是主要都是以优化养殖结构,开展病原及流行病学研究,然而对于马氏珠母贝分子免疫机制和相关功能基因的研究还只有零星报道。因此,本研究通过溶藻弧菌的诱导,应用 SSH 技术构建了马氏珠母贝的血淋巴 cDNA 差

减文库,并结合生物信息学技术分离和鉴定了差异表达的基因,为进一步克隆马氏珠母贝相关功能基因、分析基因的组织特异性表达以及探讨马氏珠母贝免疫防御的分子机制提供了背景资料。

SSH 技术自 1996 年报道以来,因其具有特异高效、简便易行等突出优点,与其它多种分子生物学技术相结合,已成为当今研究组织细胞中基因差异表达的有效工具,被广泛应用于鉴定哺乳类、鸟类、爬行动物及鱼类等动物免疫相关基因^[5-11]。近年来,应用 SSH 技术分离鉴定贝类免疫防御相关基因也逐渐成为贝类免疫学研究热点之一,如 Tanguy 等^[12]、Gestal 等^[2]、Prado-Alvarez 等^[4]、Wang 等^[3] 分别构建了太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*)、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)、文蛤以及杂色鲍的 SSH 差减文库,并分离和鉴定了多种差异表达基因。本研究中,通过对随机挑取的 600 个克隆进行测序分析后,共获得了 414 条有效 ESTs 序列,其中 167 个 ESTs 序列与 NCBI 数据库中已知功能蛋白具较高同源性,43 个 ESTs 序列为未知功能蛋白,204 个 ESTs 序列在数据库中未发现同源序列,实验数据极大地丰富了马氏珠母贝 ESTs 数据资源。

GenBank 数据库中软体动物的数据匮乏对本研究中生物信息学分析部分造成了极大的限制。在获得的 414 个 ESTs 序列中,有 43 个 ESTs 未知功能蛋白,占 10.39%,而有 204 个 ESTs 序列(占 49.28%) 在数据库中找不到同源序列,这一部分 ESTs 序列可被定义为新基因。同样的问题也存在于对其它贝类 EST 研究中,如 Gestal 等^[2] 对文蛤的血淋巴 EST 文库研究中发现,获得的全部 253 个 ESTs 序列中有 18 个为未知基因,占 7%,而有 134 个 ESTs 序列(占 54%) 在数据库中找不到同源序列;Prado-Alvarez 等^[4] 构建的文蛤血淋巴正、反向差减文库中筛选的所有 ESTs 序列中分别有 62% 和 60% 的 ESTs 序列在 GenBank 中找不到同源序列。造成这一问题的原因是由于对海洋生物尤其是贝类的大规模 EST 分析还比较少。因此,对于海洋生物特别是贝类的差别表达基因的研究,尤其是基因功能的研究亟需进一步的加强。

本研究中对于 EST 数据进行功能分类是参考其它贝类以及人类功能基因的分类方法,但在分类过程中发现某些 ESTs 序列根据其名称似乎

具有多重作用,如组织蛋白酶 L^[13]、泛素^[14-15]等;还有一些 ESTs 序列似乎并不属于任何一类。造成这一结果的主要原因是各物种间在进化地位上的差异,许多基因可能并未出现明确分化,并且二者之间的基因差异较大。因此,要建立一种合理的 EST 功能分类方法需要进一步对该物种的生理机制和代谢过程进行深入的研究。有关贝类免疫防御机制的探讨还处于初级阶段,而对于免疫相关功能基因的研究和利用还远远落后于高等陆生脊椎动物。因此,对于贝类免疫学的研究迫切需要大量全面、细致的工作。本研究的主要意义首先在于它为马氏珠母贝防病、抗病以及遗传育种工作提供了重要的理论基础,许多类型的基因都是首次在马氏珠母贝中报道;其次,某些重要的免疫防御相关功能基因的发现可以直接运用到生产实践当中,如热休克蛋白等可以作为高效的分子标记,应用于养殖和生态学的研究,以监测贝类生长环境中物理化学条件的变化,更好地指导养殖生产;同时凝集素基因^[16-19]、 α 2-巨球蛋白基因^[20-22]等可以用作选育优良抗病品系的标记。

总之,SSH 及 EST 技术应用于马氏珠母贝功能基因的研究是一次成功的尝试,也为今后有关马氏珠母贝的分子生物学方面的研究提供了重要的参考。随着我国海水珍珠养殖业的迅速发展,对马氏珠母贝的分子生物学研究的要求也越来越高,各种新技术的发明和应用为其提供了极大的便利条件。相信随着研究手段的发展和投入的增加,马氏珠母贝的健康养殖和珍珠产业可持续发展的目标也必将实现。

参考文献:

- [1] Zhang G F, Xue Z F. Study on massive death and the measures of prevention of culture mollusk in China [J]. China Fisheries, 1999(9):34-39. [张国范,薛真福.我国养殖贝类大规模死亡的原因分析及防治对策.中国水产,1999(9):34-39.]
- [2] Gestal C, Costa M, Figueras A, et al. Analysis of differentially expressed genes in response to bacterial stimulation in hemocytes of the carpet-shell clam *Ruditapes decussatus*: Identification of new antimicrobial peptides[J]. Gene, 2007, 406(1-2): 134-143.
- [3] Wang K J, Ren H L, Xu D D, et al. Identification of the up-regulated expression genes in hemocytes of variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) challenged with bacteria [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2008, 32(11):1326-1347.
- [4] Prado-Alvarez M, Gestal C, Novoa B, et al. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2009, 26(1): 72-83.
- [5] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells[J]. Acta Hydrobiologica, 2003, 27(2):113-118. [张义兵,石耀华,桂建芳.鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建.水生生物学报, 2003, 27(2):113-118.]
- [6] Lu Q, Ren R W, Wang W D, et al. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2001, 21(4):347-349. [卢强,任瑞文,王文东,等.致病性嗜水气单胞菌气溶素基因 PCR 检测方法的建立.中国兽医学报, 2001, 21(4):347-349.]
- [7] Cason A, Fregeneda J, Aller M, et al. Cloning, characterization, and insertional inactivation of a major extracellular serine protease gene with elastolytic activity from *Aeromonas hydrophila* [J]. Journal of Fish Disease, 2000, 23(1):49-59.
- [8] Chu W H, Lu C P. Cloning and sequence analysis of an extracellular serine-protease gene of *Aeromonas hydrophila* J-1 [J]. Journal of Fisheries of China, 2004, 28(1):84-88. [储卫华,陆承平.嗜水气单胞菌 J-1 株丝氨酸蛋白酶基因克隆与序列分析.水产学报, 2004, 28(1):84-88.]
- [9] Pollard D R, Johnson W M, Lior H, et al. Detection of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* by the polymerase chain reaction [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(11):2477-2481.
- [10] Zhou X X, Huang R, Guo Q L, et al. Construction of a subtractive cDNA library from the internal organs of *Trionyx sinensis* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2007, 31(4):509-515. [周秀霞,黄容,郭琼林.嗜水气单胞菌感染的中华鳖主要器官差减 cDNA 文库的构建.水生生物学报, 2007, 31(4): 509-515.]
- [11] Li C, Chen M, Li L P, et al. Construction and identification of subtractive cDNA library from peripheral blood leucocytes of tilapia [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(4):

- 1286 – 1292. [李超, 陈明, 李莉萍, 等. 罗非鱼免疫前后白细胞 cDNA 差减文库的构建及鉴定. 西南农业学报, 2010, 23(4): 1286 – 1292.]
- [12] Tanguy A, Guo X, Ford S E. Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. gigas*) oysters [J]. *Gene*, 2004, 338(1): 121 – 131.
- [13] Tingaud-Sequeira A, Cerdà J. Phylogenetic relationships and gene expression pattern of three different cathepsin L (Ctsl) isoforms in zebrafish: Ctsla is the putative yolk processing enzyme [J]. *Gene*, 2007, 386(1 – 2): 98 – 106.
- [14] Vierstra R D, Langan S M, Haas A L. Purification and initial characterization of ubiquitin from the higher plant, *Avena sativa* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, 260(22): 12015 – 12021.
- [15] Vijay-Kumar S, Bugg C E, Wilkinson K D. Comparison of the three-dimensional structures of human, yeast, and oat ubiquitin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(13): 6396 – 6399.
- [16] Huang J, Zhang C, Ma Z, *et al.* A novel extracellular EF-hand protein involved in the shell formation of pearl oyster [J]. *Biochimica et Biophysica Acta- General Subjects*, 2007, 1770(7): 1037 – 1044.
- [17] Kim J Y, Kim Y M, Cho S K, *et al.* Noble tandem-repeat galectin of Manila clam *Ruditapes philippinarum* is induced upon infection with the protozoan parasite *Perkinsus olseni* [J]. *Development and Comparative Immunology*, 2008, 32(10): 1131 – 1141.
- [18] Luo T, Yang H, Li F, *et al.* Purification, characterization and cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2006, 30(7): 607 – 617.
- [19] Pace K E, Lebestky T, Hummel T, *et al.* Characterization of a novel *Drosophila melanogaster* galectin-expression in developing immune, neural, and muscle tissues [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(15): 13091 – 13098.
- [20] Armstrong P B, Quigley J P. α_2 -Macroglobulin: an evolutionarily conserved arm of the innate immune system [J]. *Development and Comparative Immunology*, 1999, 23(4 – 5): 375 – 390.
- [21] James K. Interactions between cytokines and α_2 -macroglobulin [J]. *Immunology Today*, 1990, 11: 163 – 166.
- [22] Mathew S, Arandjelovic S, Beyer W F, *et al.* Characterization of the interaction between α_2 -macroglobulin and fibroblast growth factor-2: the role of hydrophobic interactions [J]. *Biochemical Journal*, 2003, 374(1): 123 – 129.

Analysis of differentially expressed genes in response to *Vibrio alginolyticus* stimulation in hemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*)

WANG Zhongliang^{1,2}, JIAN Jichang^{1,3}, LU Yishan^{1,3}, WANG Bei^{1,3}, CHEN Gang^{1,2}, WU Zaohe^{3,4*}

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal,

Regular High Education Institute of Guangdong Province, Zhanjiang 524088, China;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals,

Zhanjiang 524088, China;

4. Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: The pearl oyster, *Pinctada fucata*, is the most important species cultured widely for production of marine pearls in the coastal provinces of South China, while mass mortalities of the cultured pearl oyster have occurred frequently in juvenile, mother and operated oysters. Understanding the immune defense mechanisms of the pearl oyster may contribute to the development of novel management strategies for diseases control and the long-term sustainability of pearl industry. In this study, a suppression subtractive hybridization (SSH) cDNA library was constructed from the hemocytes of *P. fucata* challenged with *Vibrio alginolyticus*, and β -actin gene was used as internal control to estimate the efficiency of subtractive cDNA. A total of 600 clones in the SSH library were randomly selected and sequenced. The results showed that β -actin was subtracted significantly at about 2^{10} folds, suggested that the subtractive cDNA library was successfully constructed. PCR analysis showed that the inserts were 100 – 750 bp in length. Based on BLAST searches in NCBI, 167 ESTs (40.34%) exhibited homology with genes of known functions, and 7 of the 167 ESTs (1.69%) were possibly related to immune and stress functions, and the remaining 204 ESTs had no significant matches with known sequences in the GenBank database. Altogether, the results obtained from this paper provide valuable information for further investigating the molecular immune mechanism of *P. fucata*.

Key words: *Pinctada fucata*; *Vibrio alginolyticus*; SSH; cDNA library

Corresponding author: WU Zaohe. E-mail: wuzaohe@163.com