

中国对虾抗 WSSV 相关基因表达特征的 DDRT-PCR 分析

赖晓芳^{1,2,3}, 孔杰², 王清印², 王伟继²

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 3. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为了分析中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗白斑综合征病毒(WSSV)相关的分子机理,本研究以中国对虾“黄海2号”作为实验材料,进行白斑综合征病毒感染实验,感染20 d后获得了59尾存活的对虾。采用mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)分析感染实验中、早期濒死中国对虾和感染20 d后仍存活对虾基因表达的差异,共回收到46个阳性差异片段。差异片段序列同源性功能分析的结果表明,差异片段所编码的蛋白主要参与氧化磷酸化、蛋白质合成、糖酵解、信号转导等生物过程。以上结果初步反映了中国对虾抗白斑综合征病毒相关基因的表达特征,为研究对虾抗白斑综合征病毒的作用机制及培育抗白斑综合征病毒对虾新品种提供了基础数据。[中国水产科学,2010,17(2): -]

关键词: 中国对虾; 抗白斑综合征病毒; mRNA 差异显示技术;

中图分类号: S945.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02--08

对虾白斑综合征是一种由白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)引起的高度传染的病毒疾病,1992年最早爆发于中国台湾,目前已成为威胁对虾养殖业的主要疾病^[1]。WSSV的致病性极强且宿主几乎覆盖了所有的甲壳动物,至今生产上未找到治疗或完全阻止该病毒传播的方法^[2-3];另外,由于对虾属于无脊椎动物,其免疫防御属于非特异性免疫,因此,如何从对虾自身寻找其与抗WSSV相关的分子基础并为WSSV引起的病害提供分子生物学依据,进而从根本上防控WSSV引起的病害问题已成为当前的研究热点之一。AFLP^[4]、RAPD^[5]及SSR^[6]先后在DNA水平用于分析中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)抗WSSV相关的分子基础,筛选与抗WSSV相关的分子标记及QTL定位。另外,在基因表达水平上,已经采用cDNA微阵列^[7-8]、mRNA差异显示^[9]、抑制性差减杂交^[10-11]和表达序列标签^[12]等方法来研究抗WSSV相关基因的表达特征,如目前已

经分别从斑节对虾(*Penaeus monodon*)和日本对虾(*Marsupenaeus japonicus*)中克隆了在人工感染WSSV早期表达量上调的Rab GTPase^[13]、Toll receptor^[14]、Pm-fortilin^[15]、caspase^[16]、focal adhesion kinase^[17]、PmAV^[18]等基因。以上这些基因表达的研究都是在人工感染WSSV 72 h之内取材,属于对WSSV急性感染后对虾应急反应的分子机理研究范畴,然而绝大多数对虾通常在感染WSSV后3~10 d死亡^[19],因此有必要延长取材的时间范围,以便更好地阐释对虾抗WSSV的分子机制。我们在实际研究中发现,在中国对虾WSSV病毒感染后,有些很快发病死亡,而有些多达20多天仍然未死亡,因此研究这两类对虾间的基因差异表达情况,对于揭示对虾抗WSSV的分子机制意义重大。为了更好地探讨对虾抗WSSV作用的分子机制,以及建立发展抗WSSV的中国对虾分子标记辅助育种技术提供理论依据,本研究采用mRNA差异显示技术,对人工感染WSSV实验中早期濒死的

收稿日期: 2009-10-12; 修订日期: 2009-11-25.

基金项目: 国家863计划项目(2006AA10A406); 公益性行业(农业)科研专项(200803012).

作者简介: 赖晓芳(1975-),女,博士研究生,主要从事水产动物遗传育种研究. E-mail: lai.xiaofang@163.com

通讯作者: 王清印,研究员,博士生导师. Tel: 0532-85823291; E-mail: qywang@public.qd.sd.cn

和 20 d 后仍存活的中国对虾的基因表达进行比较, 为揭示中国对虾抗 WSSV 作用机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 中国对虾 实验共采用中国对虾 1 500 尾, 分别来源于“黄海 2 号”的 75 个家系, 每个家系随机选取体长和体质量大体一致的 20 尾仔虾。体长

(4.69 ± 0.55) cm, 体质量(2.06 ± 0.72) g。

1.1.2 引物

参照王刚石^[20]的方法, 实验中用于差异显示研究的锚定引物为 T₇d(T)₁₂APN(ACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTT(N=A/G/C)), 共采用 16 个随机引物(表 1), 相应序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 研究中使用的随机引物
Tab. 1 Random primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')
M ₁₃ r-ARP1	ACAATTTACACAGGAGATTGCC
M ₁₃ r-ARP2	ACAATTTACACAGGACGACTGT
M ₁₃ r-ARP3	ACAATTTACACAGGATGCTCAG
M ₁₃ r-ARP4	ACAATTTACACAGGACTCAACG
M ₁₃ r-ARP5	ACAATTTACACAGGAAGTAGGC
M ₁₃ r-ARP6	ACAATTTACACAGGAGCACCAT
M ₁₃ r-ARP7	ACAATTTACACAGGAAACGAGG
M ₁₃ r-ARP8	ACAATTTACACAGGATTACCGC
M ₁₃ r-ARP9	ACAATTTACACAGGACATTCCG
M ₁₃ r-ARP10	ACAATTTACACAGGACAAGTCC
M ₁₃ r-ARP11	ACAATTTACACAGGACGGGTAA
M ₁₃ r-ARP12	ACAATTTACACAGGAGAGTGCT
M ₁₃ r-ARP13	ACAATTTACACAGGACTGACTG
M ₁₃ r-ARP14	ACAATTTACACAGGATGTTGTC
M ₁₃ r-ARP15	ACAATTTACACAGGAACGCAAC
M ₁₃ r-ARP16	ACAATTTACACAGGATAGAGCG
M ₁₃ reverse (-48) 24-mer	AGCGGATAACAATTTACACAGGA
T ₇ promoter 22-mer	GTAATACGACTCACTATAGGGC

1.2 实验方法

1.2.1 白斑综合征病毒感染实验 中国对虾“黄海 2 号”在黄海水产研究所鳌山卫中国对虾遗传育种中心人工育苗, 2008 年 7 月 16 日分别用 VIE (visible implant elastomer) 进行荧光标记并暂养 15 d 后转移至山东海阳黄海水产有限公司海珍品养殖基地进行人工感染 WSSV 实验, 具体方法参照杨翠华等^[21]并稍加改进。将实验对虾放养在同一圆形水泥池 25 m³ (内径 5 m, 高 1.27 m) 中混养, 饥饿 24 h 后, 投喂感染 WSSV 后死亡且白斑症状典型的日本对虾肌肉组织块, 投喂量为对虾生物量的 15%。之后继续投喂蛤蜊并辅之配合饲料至实验结束。实验

水温(28.5 ± 0.5) °C, 盐度 28。每隔 1 h 捞取死虾及濒死对虾 1 次, 实验时间持续 20 d。选取白斑综合征病毒感染实验中早期濒死和 20 d 后存活的对虾肝胰腺组织经液氮速冻后转 -80 °C 保存备用。以不投喂毒饵的未感染中国对虾作为对照。

1.2.2 总 RNA 的提取与纯化及反转录合成 cDNA

第一链 分别取 -80 °C 保存的白斑综合征病毒感染实验中早期濒死和 20 d 后存活的对虾各 10 尾的肝胰腺组织, 按照 Trizol 试剂盒 (Invitrogen) 说明进行总 RNA 的提取。总 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳判断完整后, 按照 DNase I 消化和 RNA 纯化试剂盒 (DNase I Digesting and Purifying Set, 上海华舜) 说

明去除基因组 DNA 污染,核酸定量仪(Amersham Biosciences)定量, -80°C 保存。

以 $2\ \mu\text{g}$ 上述总 RNA 为模板,分别加入 $1\ \mu\text{L}$ $100\ \mu\text{mol/L}$ T_7d (T)₁₂APN ($N=A/C/G$),用 RNase-free 水补足体积 $11\ \mu\text{L}$, 70°C 放置 $5\ \text{min}$,立即置冰上 $5\ \text{min}$ 。加入 $4\ \mu\text{L}$ $5\times\text{M-MLV buffer}$, $2\ \mu\text{L}$ dNTP ($2.5\ \text{mmol/L}$ each), $0.5\ \mu\text{L}$ RNasin ($50\ \text{U}/\mu\text{L}$),用 RNase-free 水补足 $19\ \mu\text{L}$ 体积, 37°C $5\ \text{min}$,加入 $1\ \mu\text{L}$ M-MLV ($200\ \text{U}/\mu\text{L}$, Takara), 42°C $1\ \text{h}$,然后 70°C $10\ \text{min}$ 以灭活反转录酶, -20°C 保存。

1.2.3 DDRT-PCR 分别以上述实验中制备的两类对虾的 cDNA 为模板进行 DDRT-PCR。采用 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系,内含 $2\ \mu\text{L}$ $10\times\text{PCR buffer}$ 、 $1.6\ \mu\text{L}$ dNTP ($2.5\ \text{mmol/L}$ each)、 $1.2\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$)、 $2\ \mu\text{L}$ $2\ \mu\text{mol/L}$ T_7d (T)₁₂APN ($N=A/C/G$)、 $2\ \mu\text{L}$ $2\ \mu\text{mol/L}$ $\text{M}_{13}\text{-r-ARPN}$ ($n=1\sim 16$)、 $2\ \mu\text{L}$ cDNA、 $0.2\ \mu\text{L}$ *Taq* 酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$)、 $9\ \mu\text{L}$ 无菌水。反应程序为 94°C 预变性 $3\ \text{min}$,然后依次 94°C $30\ \text{s}$, 46°C $30\ \text{s}$, 72°C $2\ \text{min}$ 4 个循环; 94°C $30\ \text{s}$, 60°C $30\ \text{s}$, 72°C $2\ \text{min}$ 30 个循环;最后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。DDRT-PCR 产物与等体积变性电泳上样缓冲液混合, 94°C 变性 $5\ \text{min}$,立即冰浴。6% 变性聚丙烯酰胺凝胶以 $50\ \text{W}$ 恒功率预电泳 $30\ \text{min}$,将变性好的 PCR 产物上样, $50\ \text{W}$ 恒功率电泳至溴酚蓝跑出玻璃板板部 $40\ \text{min}$,取下胶板银染。

将 DDRT-PCR 扩增得到的差异条带割胶,加入 $20\ \mu\text{L}$ 无菌水,捣碎, 4°C 过夜,回收差异 cDNA。以

回收的 cDNA 为模板,进行差异片段的二次 PCR 扩增: $20\ \mu\text{L}$ 反应体系中含 $2\ \mu\text{L}$ 回收差异 cDNA, $2\ \mu\text{L}$ $10\times\text{PCR buffer}$ 、 $1.6\ \mu\text{L}$ dNTP ($2.5\ \text{mmol/L}$ each)、 $1.2\ \mu\text{L}$ MgCl_2 ($25\ \text{mmol/L}$)、 $2\ \mu\text{L}$ $2\ \mu\text{mol/L}$ T_7 promoter 22-mer 、 $2\ \mu\text{L}$ $2\ \mu\text{mol/L}$ M_{13} reverse (-48) 24-mer 、 $0.2\ \mu\text{L}$ *Taq* 酶 ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$)、 $9\ \mu\text{L}$ 无菌水。反应程序为 94°C 预变性 $3\ \text{min}$,然后 94°C $30\ \text{s}$, 60°C $30\ \text{s}$, 72°C $2\ \text{min}$ 30 个循环;最后 72°C 延伸 $10\ \text{min}$ 。

1.2.4 反向 Northern 杂交验证假阳性 以 $4\ \mu\text{g}$ 上述总 RNA 为模板分别逆转录,以 DIG-dUTP 标记混合物 I 代替 dNTP 制备第一链 cDNA 探针。取 $1\ \mu\text{L}$ PCR 产物点到尼龙膜上, 80°C 干烤固定 $2\ \text{h}$ 后, Hyb 高效杂交液杂交,最后利用地高辛杂交检测试剂盒(深圳依诺金)以化学显色法进行检测。将反向 Northern 杂交结果阳性的差异片段重新二次 PCR,纯化后克隆至 pUCm-T 载体,转化 *E. coli* DH5 α ,送上海生工生物工程技术有限公司完成测序。

2 结果与分析

2.1 白斑综合征病毒感染实验对虾死亡情况

1500 尾对虾在白斑综合征病毒感染后的死亡情况见图 1。病毒感染实验中最早 30 h 后中国对虾开始出现死亡个体,44 h 死亡 93 尾,为死亡最高峰。此后死亡量回落,74 h 出现第二个死亡高峰,死亡 18 尾。130 h 后死亡量维持在每小时 1 尾左右。感染实验 20 d 后,有 30 个家系共 59 尾对虾存活,存活率为 3.9%。

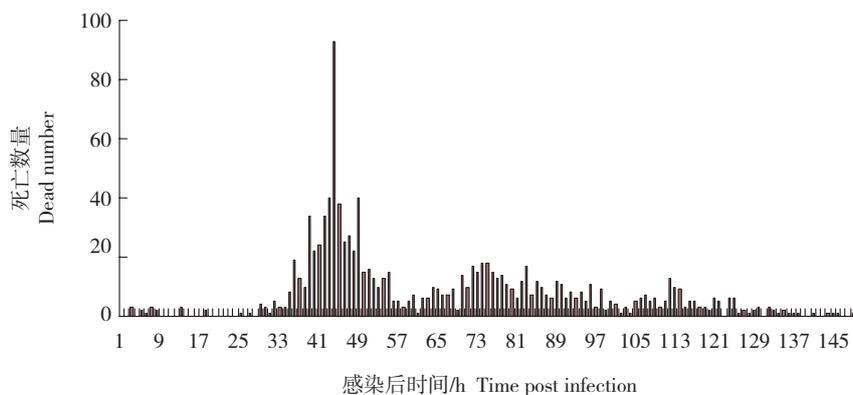


图 1 中国对虾 WSSV 感染后的死亡曲线

Fig. 1 Mortality curve of *F. chinensis* infected by WSSV

2.2 总 RNA 的提取、纯化及 cDNA 第一链的合成

总 RNA 的提取结果(图 2)显示,白斑综合征病毒感染试验中感染早期濒死、感染 20 d 后存活以及未感染(对照)的中国对虾肝胰腺组织均可提取 RNA。3 种样品提取的 RNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶电

泳中均显示 18S rRNA 和 28S rRNA 2 条带,且 18S rRNA 的显色强度显著高于 28S rRNA 的显色强度。经 M-MLV 反转录后,合成的 cDNA 第一链见图 3。从点样孔至 250 bp 间呈现“smear”状,明显可见分子量分布于 500~2 000 bp,说明总 RNA 是完整的。

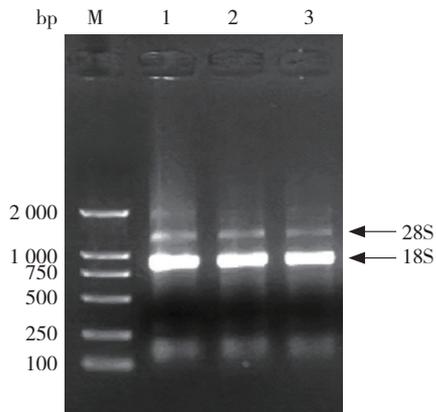


图 2 总 RNA 琼脂糖凝胶电泳图

M: DL2000; 1: 感染早期濒死对虾; 2: 感染 20 d 后存活对虾;
3: 未感染对虾(对照)

Fig. 2 Electrophoresis photograph of total RNA by agar gel
M: DL2000; 1: earliest moribund shrimp post-infection; 2: survival
shrimp 20 d post-infection; 3: uninfected shrimp (control)

2.3 DDRT-PCR

本研究选用 3 个锚定引物($T_7d(T)_{12}APN$, $N=A/G/C$)与 16 个随机引物($M_{13r}-ARP_n$, $n=1 \sim 16$)共 48 个组合进行 mRNA 差异显示,部分差异显示结果见图 4。每条泳道有 30~70 条带,共计约 3 000 条带,其中回收有差异的片段 145 个;以 $T_7d(T)_{12}APA$ 为锚定引物的有 48 个,以 $T_7d(T)_{12}APG$ 为锚定引物的有 54 个,以 $T_7d(T)_{12}APC$ 为锚定引物的有 43 个。这些差异条带主要表现为表达量上的差异,分子量大小分布在 90~1 000 bp 之间。差异片段经回收、二次 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳分离后,大多数表现为单一带型。进一步经反向 Northern 杂交验证后,有 46 个差异片段显示出表达量上的差异,假阳性率为 68.3%。其中 43 个差异片段在人工感染 WSSV 20 d 后存活的对虾中表达上调(表 2 中标识 K),3 个差异片段在人工感染 WSSV 20 d 后存活的对虾中表达下调(表 2 中标识 W)。

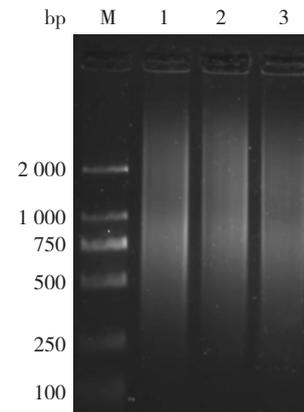


图 3 总 RNA 反转录合成 cDNA

M: DL2000; 1: 感染早期濒死对虾; 2: 感染 20 d 后存活对虾; 3: 未感染对虾(对照)

Fig. 3 cDNA reverse transcribed by total RNA
M: DL2000; 1: earliest moribund shrimp post-infection; 2: survival
shrimp 20 d post-infection; 3: uninfected shrimp group (control)

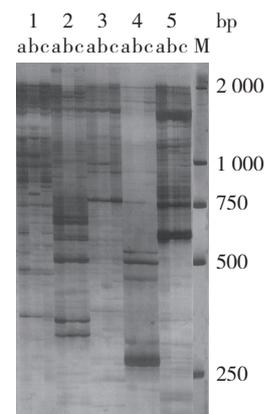


图 4 DDRT-PCR 部分结果(锚定引物: $T_7d(T)_{12}APG$; 随机引物: $M_{13r}-ARP_1 \sim 5$)

M: DL2000; a: 感染早期濒死对虾; b: 感染 20 d 后存活对虾;
c: 未感染对虾(对照)

1: $M_{13r}-ARP_1$; 2: $M_{13r}-ARP_2$; 3: $M_{13r}-ARP_3$; 4: $M_{13r}-ARP_4$;
5: $M_{13r}-ARP_5$

Fig. 4 Part results of DDRT-PCR (Anchor primer: $T_7d(T)_{12}APG$; Random primers: $M_{13r}-ARP_1 \sim 5$)

M: DL2000; a: earliest moribund shrimp post-infection; b: survival
shrimp 20 d post-infection; c: uninfected shrimp (control) 1: $M_{13r}-ARP_1$;
2: $M_{13r}-ARP_2$; 3: $M_{13r}-ARP_3$; 4: $M_{13r}-ARP_4$; 5: $M_{13r}-ARP_5$

2.4 差异片段的同源性功能分析

将经反向 Northern 杂交验证为阳性的差异片段经克隆测序后, 测序结果与 GenBank 网上数据进行

同源性功能分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 结果见表 2。

表 2 差异片段的同源性功能分析
Tab. 2 Homology comparison of differential display sequences

片段代号 Sequence No.	片段大小 /bp Length	检索结果(登录号) Search results (accession number)	片段代号 Sequence No.	片段大小 /bp Length	检索结果(登录号) Search results (accession number)
K1	465	蛋白酶活化受体(GI: 75069851) Proteinase-activated receptor	K24	183	未知功能 Unknown
K2	333	硫氧还蛋白(GI: 267114) Thioredoxin-1	K25	112	一种果蝇蛋白(GI: 17946406) A protein of <i>Drosophila melanogaster</i>
K3	436	40S 核糖体蛋白 RPS17(GI: 160550171) 40S ribosomal protein RPS17	K26	480	膜联蛋白(GI: 75027676) Annexin
K4	90	琥珀酸半醛还原酶(GI: 90109014) Succinic semialdehyde reductase	K27	440	转铁蛋白 B(GI: 20092288) Ferrous iron transport protein B
K5	256	Ala-tRNA 合成酶(GI: 223654567) Alanyl tRNA synthetase	K28	106	未知功能 Unknown
K6	409	未知功能 Unknown	K29	125	C2H2 锌指结构蛋白(GI: 220690099) C2H2 zinc finger domain protein
K7	284	阳离子运输 ATPase1(GI: 6707670) Cation-transporting ATPase 1	K30	170	未知功能 Unknown
K8	198	磷酸葡萄糖变位酶-1(GI: 12585312) Phosphoglucomutase-1	K31	249	富含 Pro 蛋白(GI: 141279) Proline-rich protein
K9	733	未知功能 Unknown	K32	485	Ser-tRNA 合成酶(GI: 30173208) Seryl-tRNA synthetase
K10	230	未知功能 Unknown	K33	380	类伸展蛋白(GI: 1076557) Extensin-like protein
K11	406	Pro-tRNA 合成酶(GI: 81820763) Prolyl-tRNA synthetase	K34	126	未知功能 Unknown
K12	141	未知功能 Unknown	K35	128	富含 Gly 蛋白(GI: 18397934) Glycine-rich protein
K13	125	Chorismate 合成酶(GI: 47169186) Chorismate synthase	K36	228	NADH 脱氢酶亚基 4(GI: 165932461) NADH dehydrogenase subunit 4
K14	214	免疫相关基因(GI: 11038136) Immune-related gene	K37	121	未知功能 Unknown
K15	232	蛋白酶 M50(GI: 166368106) Peptidase M50	K38	158	未知功能 Unknown
K16	120	未知功能 Unknown	K39	149	磷酸葡萄糖激酶(GI: 224983686) Gluconate kinase
K17	431	核糖核酸酶 H(GI: 123352453) Ribonuclease H	K40	113	未知功能 Unknown
K18	337	多核糖核苷酸核苷转移酶(GI: 187610252) Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	K41	199	多肽脱甲基酶(GI: 78100858) Peptide deformylase
K19	216	一种新结构的锌指蛋白(GI: 515101) A new structural class of zinc-finger	K42	306	未知功能 Unknown
K20	90	磷酸酶(GI: 56554252) Phosphatase	K43	160	多肽脱甲基酶(GI: 78100858) Peptide deformylase
K21	252	Ala-tRNA 合成酶(GI: 223654567) Alanyl tRNA synthetase	W1	340	几丁质结合蛋白(GI: 37983093) Chitin binding protein
K22	293	类降钙素受体(GI: 55294896) Calcitonin receptor-like	W2	459	小分子量富含 Cys 蛋白 LCR49(GI: 46396236) Low-molecular-weight cysteine-rich protein LCR49
K23	304	核仁复合体蛋白 14(GI: 56404434) Nucleolar complex protein 14	W3	336	几丁质酶(GI: 5114425) Chitinase

注: K 表示在感染 20 d 后存活对虾中表达上调的差异片段, W 表示在感染 20 d 后存活对虾中表达下调的差异片段。

Note: K indicating the differential fragments up-regulated in survival shrimps 20 d post-infection, while W indicating the genes down-regulated in survival shrimps 20 d post-infection

采用 mRNA 差异显示技术所获得的 46 个阳性差异片段中,有 13 个差异片段(表 2 中检索结果为未知功能)在 GenBank 中与已知基因的 Score 值很低(<40), Evalue 值大于 0.5,推测为功能未知,有待于进一步进行序列分析和功能鉴定。剩下的 33 个差异片段可以与已知功能的基因匹配,其中 30 个差异片段表达上调,所编码的蛋白包括参与细胞信号转导作用的蛋白酶活化受体、膜联蛋白和类降钙素受体等,氧化磷酸化过程中的硫氧还蛋白和 NADH 脱氢酶亚基 4 等,与核酸作用的锌指蛋白、核糖核酸酶 H 和多核糖核苷酸核苷转移酶等,指导特异性蛋白质合成的 40S 核糖体蛋白和氨酰-tRNA 合成酶等,对已合成的蛋白进行特异性修饰的磷酸酶、蛋白酶和多肽脱甲基酶等,参与糖代谢过程的磷酸葡萄糖变位酶、磷酸葡萄糖激酶和琥珀酸半醛还原酶等,以及具有防御功能的免疫相关基因等;其他 3 个差异片段表达下降,所编码的蛋白为几丁质结合蛋白、几丁质酶和小分子量富含 Cys 蛋白等。

3 讨论

3.1 对虾抗 WSSV 的选育

虽然对虾类有关抗病力遗传参数报道较少,对虾血液中某些免疫相关组分的遗传力估计值也很低,但是大多数免疫性状通过选择育种能够得到改善,从而使选育群体抗病和抗逆能力整体水平得到提高^[22]。经过 15 代以上的筛选,IFREMER 培育出蓝对虾 SPR43,对 IHNV 有明显的抗性^[23]。同时,连续 3 年从染病存活的中国对虾养殖池中选留亲虾进行选育的第 3 代也表现出明显的抗病力^[24]。本研究以中国对虾“黄海 2 号”为实验材料,人工感染 WSSV 后,有 3.9% 的对虾能存活 20 d 以上,具有明显的抗病性。且家系间差异显著,有的家系有 5 尾能存活 20 d 以上,有的家系存活时间只有 (45.6 ± 16.5) h。这说明其抗病力的大小很可能与遗传因素有关,这为深入分析抗病的分子机理提供了理论上可行的前提。

3.2 对虾抗 WSSV 的分子基础

对虾属于无脊椎动物,在受到细菌、病毒侵染

时,主要通过非特异性免疫进行防御,其抗病能力主要受到抗性相关基因表达差异的影响。研究结果一致表明,差异表达的基因所编码的蛋白主要参与信号转导、氧化磷酸化、蛋白质合成、糖酵解途径、免疫防御及细胞结构等生物过程^[7-8,25-26]。

本研究结果显示,参与细胞骨架运动、调节细胞生长、形成膜离子通道、参与细胞信号转导等作用的膜联蛋白和具有免疫防御功能的基因等在人工感染 WSSV 后的对虾中表达上调,Dhar A K 等^[7]、Leu J H 等^[25]、Wang B 等^[8]及 Ratre Wongpanya^[26]等也先后类似的情况,提示 WSSV 的感染将引起对虾免疫系统进行自身防御。

然而参与代谢和内稳态基因表达的变化则有不同的报道。Wang B 等^[8]发现人工感染 WSSV 6 h 后中国对虾中与代谢和体内平衡相关的 ATP 合酶 A 链、精氨酸激酶、MNN4、磷酸丙酮酸水合酶等表达下降。本研究及 Leu J H 等^[25]的结果却是氧化磷酸化及糖酵解有关的酶的表达在人工感染 WSSV 后上调。原因可能是由于三者实验用虾人工感染 WSSV 的时间不同,对虾对 WSSV 的抵抗作用也就处于不同的生理阶段,能量代谢有关基因的表达也处于波动状态^[8]。

另外编码 40S 核糖体蛋白的差异片段在本研究及 Leu J H 等^[25]和 Ratre Wongpanya 等^[12]中均显示为表达上调,多种氨酰-tRNA 合成酶表达同时上调,提示人工感染 WSSV 后蛋白质特别是参与免疫防御反应的蛋白质合成增加。本研究中锌指蛋白、磷酸酶、蛋白酶、多肽脱甲基酶等同时上调表达,估计是对已合成的蛋白质进行特异性修饰,使其具有特异的功能,参与对虾抗 WSSV 过程。

综上所述,本研究证明了对虾在 WSSV 侵染后基因表达发生了显著变化,同时也为更好的阐述对虾抗 WSSV 的作用机理,为发展抗 WSSV 的中国对虾分子标记辅助育种技术提供了理论依据。在此基础之上,本研究将进一步开展的工作是将 mRNA 差异显示技术所获得的差异片段进行基因全长的克隆和表达,在转录水平和表达水平更深入研究其在抗 WSSV 上的功能。

参考文献:

- [1] Chou H Y, Huang C Y, Wang C H, et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan [J]. Dis Aquat Org, 1995, 23: 165-173.
- [2] 刘萍, 孔杰, 孟宪红, 等. 白斑综合征病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查 [J]. 海洋水产研究, 2000, 21 (3): 9-12.
- [3] 何建国, 周化民, 姚伯, 等. 白斑综合征杆状病毒的感染途径和宿主种类 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38 (2): 65-69.
- [4] 岳志芹, 王伟继, 孔杰, 等. 用 AFLP 方法分析中国对虾抗病选育群体的遗传变异 [J]. 水产学报, 2005, 29 (1): 13-19.
- [5] 孟宪红, 孔杰, 刘萍, 等. 中国明对虾抗白斑综合征病毒分子标记的筛选 [J]. 中国水产科学, 2005, 112 (11): 14-19.
- [6] Dong S R, Kong J, Meng X H, et al. Microsatellite DNA markers associated with resistance to WSSV in *Penaeus (Fenneropenaeus) chinensis* [J]. Aquaculture, 2008, 282 (1-4): 138-141.
- [7] Dhar A K, Dettroi A, Roux M M, et al. Identification of differential expressed genes in shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with white spot syndrome virus by cDNA microarrays [J]. Arch Virol, 2003, 148: 2381-2396.
- [8] Wang B, Li F, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. Mar Biotechnol (NY), 2006, 8: 491-500.
- [9] Astrofsky K M, Roux M M, Klimple K R, et al. Isolation of differentially expressed genes from white spot syndrome virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) [J]. Arch Virol, 2002, 147: 1799-1812.
- [10] Pan D, He N, Yang Z, et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization [J]. Dev Comp Immunol 2005, 29: 103-112.
- [11] He N, Qin Q, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization [J]. Antivir Res, 2005, 66: 39-45.
- [12] Rojtinnakorn J, Hirono I, Itami T, et al. Gene expression in hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach [J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 69-83.
- [13] Wu W L, Zhang X B, et al. Characterization of a Rab GTPase up-regulated in the shrimp *Penaeus japonicus* by virus infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23 (2): 438-445.
- [14] Joop A J Arts, Ferry H J. Cornelissen. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23 (3): 504-513.
- [15] Moltira Tonganunt, Benjamas Nupan, Manasawan Saengsakd, et al. The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25 (5): 633-637.
- [16] Kanokpan Wongprasert, Pakkakul Sangsuriya, Amornrat Phongdar, et al. Cloning and characterization of a caspase gene from black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)-infected with white spot syndrome virus (WSSV) [J]. J Biotechnol, 2007, 131 (1): 9-19.
- [17] Zhang Mingchang, Wang Huifen, Li Dengfeng, et al. A novel focal adhesion kinase from *Marsupenaeus japonicus* and its response to WSSV infection [J]. Developm Comparat Immunol, 2009, 33 (4): 533-539.
- [18] Luo Tian, Zhang Xiaobo, Shao Zongze, et al. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon* [J]. FEBS Letters, 2003, 551: 53-57.
- [19] Van Hulten MC, Witteveldt J, Peters S, et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence [J]. Virology, 2001, 286: 7-22.
- [20] 王刚石, 王孟薇, 尤经纬, 等. 荧光标记 mRNA 差异显示技术 [J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16 (4): 373-376.
- [21] 杨翠华, 孔杰, 王清印, 等. 控制环境养殖下近交对中国对虾早期体重和抗 WSSV 性状的影响 [J]. 水产学报, 2007, 31 (2): 226-234.
- [22] 杨翠华, 孔杰, 王清印, 等. 中国对虾 6 项免疫相关组分的估计遗传力和遗传相关 [J]. 科学通报, 2007, 52 (2): 183-191.
- [23] Goyard E., Patro J. et al. IFREM ER' s shrimp genetics program [J]. The Advocate, 1999, 12: 26-28.
- [24] 张庆文, 刘萍, 王伟继, 等. 中国对虾抗病群体选育的初步研究 [J]. 海洋水产研究, 2002, 23 (2): 53-57.
- [25] Leu J H, Chang C C, Wu J L, et al. Comparative analysis of differentially expressed genes in normal and white spot syndrome virus infected *Penaeus monodon* [J]. Bio Med Central. 2007, 8: 120-133.
- [26] Ratre Wongpanya, Takashi Aoki, Ikuo Hirono, et al. Analysis of gene expression in haemocytes of shrimp *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus by cDNA microarray [J]. Science Asia, 2007, 33: 165-174.
- [27] Han F, Zhang X B. Characterization of a ras-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23: 937-944.

Analysis of molecular basis related to WSSV-resistance in *Fenneropenaeus chinensis* by mRNA differential Display PCR

LAI Xiaofang^{1,2,3}, KONG Jie², WANG Qingyin², WANG Weiji²

(1.College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 3. Ocean and Fisheries College, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: White spot syndrome was a viral disease that seriously threatened shrimp aquaculture. In order to study the molecular basis related to WSSV-resistance in *Fenneropenaeus chinensis*, “Huanghai No.2” was challenged by WSSV. There were 59 shrimps survived from the challenge experiment after twenty days post-infection in the end. The gene expression in survival shrimps twenty days post-infection was compared with the earliest moribund shrimps in post-infection by mRNA Differential Display PCR. Forty-six positive differential fragments were recovered. Then sequences of the positive differential fragments were determined and blasted in GenBank. Most of them were found to code proteins related to oxidative phosphorylation, protein synthesis, glycolysis and signal transduction. The study showed partly the molecular basis related to WSSV-resistant in shrimp, and provided basis data for understanding mechanisms related to WSSV-resistant in shrimp studying and the WSSV-resistant shrimp breeding. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2) :]

Key words: *Fenneropenaeus chinensis*; WSSV-resistant; mRNA differential display PCR

Corresponding author: WANG Qingyin. E-mail: qywang@public.qd.sd.cn