

皱纹盘鲍肝胰腺和肾脏维生素C缺乏诱导的差异表达cDNA文库的构建

王嘉, 马洪明, 麦康森, 张文兵, 刘付志国

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术研究皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino.) Vc 缺乏诱导的差异表达基因。实验用皱纹盘鲍成鲍初始体质量为 (74.32±0.43) g, 初始壳长为 (84.36±0.24) mm。配制了 Vc 缺乏 (0.0 mg/kg) 和高剂量添加 (4 967.5 mg/kg) 2 个水平的人工饲料进行饲喂。经过 170 d 的养殖后, 分别构建肝胰腺和肾脏 Vc 缺乏消减 cDNA 文库。消减杂交效率分析显示, 差异表达的基因分别被富集了大约 2^5 和 $2^5 \sim 2^{10}$ 倍。从两个文库中随机挑选阳性克隆进行测序。在肝胰腺消减 cDNA 文库中获得 63 个片段, 其中已知功能基因占 54.0%, Gene ontology (GO) 按照功能将其分为 4 类: 代谢相关基因占 15.9%, 细胞代谢相关基因占 30.2%, 生物调节相关基因占 4.8%, 其他功能基因占 3.2%。未知功能基因占 46.0%。在肾脏消减 cDNA 文库中获得 39 个片段, 其中已知功能基因占 53.8%, GO 将其分为 3 类: 代谢相关基因占 5.1%, 细胞代谢相关基因占 28.2%, 生物调节相关基因占 20.5%。未知功能基因占 46.2%。其中, 获得了包括细胞色素 c 氧化酶、葡萄糖-1 脱氢酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -1,3-D-葡聚糖酶、纤维素酶、藻酸盐裂解酶以及铁蛋白等在其他动物中被证明与 Vc 合成相关的基因, 为进一步研究皱纹盘鲍 Vc 的合成和代谢奠定了基础。[中国水产科学, 2010, 17 (4): 619-629]

关键词: 皱纹盘鲍; 肝胰腺; 肾脏; 维生素 C; 抑制消减杂交; 消减 cDNA 文库

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)04-0619-11

维生素 C (Vc) 又称抗坏血酸, 是动物体内重要的水溶性抗氧化剂, 在生物的代谢过程中发挥着重要作用。其在生物体内既可以作为受氢体, 又可以作为供氢体, 参与多种氧化还原过程, 对氨基酸的氧化、胶原蛋白的合成、亚铁离子的吸收和转运等起着重要作用^[1-2]。在水生动物 Vc 营养研究中发现, 对于翘嘴鲌 (*Culter alburnus*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 以及大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 等自身无法合成 Vc 的真骨鱼类, 饲料中高含量的 Vc 能显著提高其存活、生长、体组织 Vc 含量以及免疫力和抗病力^[3-5]。而饲料中的 Vc 含量对于自身具有 Vc 合成能力的西伯利亚鲟 (*Acipenser baerii*) 的生长、存活均没有影响, 但高含量的 Vc 对于其达到最佳

非特异性免疫应答是必须的^[6]。皱纹盘鲍 (*Haliotis discus hannai* Ino.) 是藻食性的大型腹足动物, 是中国北方的重要经济养殖贝类。Mai^[7]在对欧洲疣鲍 (*Haliotis tuberculata* L.) 和皱纹盘鲍幼体的研究中发现, 饲料中不同添加梯度的 Vc 对二者的存活和生长均没有显著影响, Vc 缺乏和低量添加组没有出现 Vc 缺乏症, 由此推测鲍有可能具有 Vc 生物合成能力。

抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 适用于分离 2 个 mRNA 群体间差异表达的基因。该技术克服了 mRNA 差别显示技术 (DDRT-PCR) 假阳性较高和代表性差示分析 (RDA) 消减杂交轮次较多的缺点^[8-9], 并且目的基因间丰度的差异经过均衡化后已基本消除, 从而成为最有

收稿日期: 2010-03-03; 修订日期: 2010-03-26.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30972262).

作者简介: 王嘉 (1981-), 男, 博士研究生, 研究方向: 营养与基因表达. E-mail: wjyr@sina.com

通讯作者: 麦康森, 教授, 博士生导师. Tel: 0532-82032038. E-mail: kmai@ouc.edu.cn

效的筛选差异表达基因的手段。本研究通过Vc缺乏(0.0 mg/kg)和高剂量(4 967.5 mg/kg)添加水平的饲料饲喂皱纹盘鲍成鲍170 d,利用SSH技术,构建了皱纹盘鲍肝胰腺和肾脏组织Vc缺乏差异表达的cDNA文库,旨在为研究皱纹盘鲍Vc代谢的相关机制提供分子生物学基础。

1 材料与方法

1.1 实验饲料

基础配方参照Mai^[7]的配方,稍加改动,成分见表1。以酪蛋白(vitamin-free, Sigma)和明胶作为蛋白源,大豆油和鱼油(质量比1:1)作为脂肪源,糊精作为主要的糖源。Vc的添加形式为L-抗坏血酸-2-磷酸酯(L-ascorbate-2-monophosphate, Vc含量 $\geq 35\%$), Vc缺乏和高剂量2个添加水平分别为0和

5 000 mg/kg饲料,高效液相色谱(HPLC)法^[4]测定饲料中Vc的实际含量为0.0和4 967.5 mg/kg饲料。饲料的具体制作参照Mai^[7]的方法。

1.2 实验分组及管理

实验用的皱纹盘鲍成鲍购买自青岛薛家岛鲍养殖场,初始体质量为(74.32 \pm 0.43)g,初始壳长为(84.36 \pm 0.24)mm,在中国海洋大学岙山卫生命科学与技术教学与科研基地的室内流水系统中养殖。正式实验开始前,用基础饲料驯化4周,然后随机分为2组,每组3个重复,每个重复15只,在150 L的玻璃钢桶中养殖。养殖持续170 d,每天17:00–18:00投喂饲料,次日8:00–9:00吸底清除残饵粪便。养殖期间水温为7.8~20.0℃,盐度为31~34, pH值为7.5~8.0,溶解氧 > 7 mg/L。每3天刷桶清除桶壁上可能附着的藻类,防止鲍刮食造成额外的Vc摄入。

表1 基础饲料配方表
Tab. 1 Diet formulation and chemical composition of basic diet

成分 Ingredients	组成 Composition	% DW
酪蛋白 Casein vitamin-free	25.00	
明胶 Gelatin	6.00	
糊精 Dextrin	33.50	
羧甲基纤维素 Carboxymethylcellulose, CMC	5.00	
褐藻酸钠 Sodium alginate	20.00	
矿物质混合物 Mineral mix ^a	4.50	
维生素混合物 Vitamin mix, Vc free ^b	2.00	
氯化胆碱 Choline chloride	0.50	
豆油/鱼油 SO/MFO ^c	3.50	
主要成分 Raw composition, n=3		
粗蛋白 Crude protein	30.10	
粗脂肪 Crude lipid	3.38	
灰分 Ash	12.23	

注: a. 矿物质混合物,每1 000 g饲料包含: NaCl, 0.4 g; MgSO₄·7H₂O, 6.0 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10.0 g; KH₂PO₄, 20.0 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8.0 g; 柠檬酸铁, 1.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 141.2 mg; MnSO₄·4H₂O, 64.8 mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4 mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4 mg; KIO₃, 1.2 mg; Na₂SeO₃, 0.4 mg.

b. 维生素混合物,每1 000 g饲料包含: 维生素B1 HCl, 120.0 mg; 核黄素, 100.0 mg; 叶酸, 30.0 mg; 维生素B6 HCl, 40.0 mg; 烟酸, 800.0 mg; 泛酸钙, 200.0 mg; 肌醇, 4 000.0 mg; 生物素, 12.0 mg; 维生素E, 450.0 mg; 维生素K, 80.0 mg; 维生素B12, 0.18 mg; 维生素A, 100 000 IU; 维生素D, 2 000 IU. c. 豆油和鱼油(质量比1:1),添加0.001%的乙氧基喹啉.

Note: a. Mineral mix; each 1 000 g of diet contained: NaCl, 0.4 g; MgSO₄·7H₂O, 6.0 g; NaH₂PO₄·2H₂O, 10.0 g; KH₂PO₄, 20.0 g; Ca(H₂PO₄)₂·H₂O, 8.0 g; Ferric citrate, 1.0 g; ZnSO₄·7H₂O, 141.2 mg; MnSO₄·4H₂O, 64.8 mg; CuSO₄·5H₂O, 12.4 mg; CoCl₂·6H₂O, 0.4 mg; KIO₃, 1.2 mg; Na₂SeO₃, 0.4 mg. b. Vitamin mix; each 1 000 g of diet contained: Thiamin HCl, 120.0 mg; Riboflavin, 100.0 mg; Folic acid, 30.0 mg; Pyridoxine HCl, 40.0 mg; Niacin, 800.0 mg; Ca pantothenate, 200.0 mg; Inositol, 4 000.0 mg; Biotin, 12.0 mg; Vitamin E, 450.0 mg; Vitamin K, 80.0 mg; Vitamin B12, 0.18 mg; Vitamin A, 100 000 IU; Vitamin D, 2 000 IU. c. Mass ratio of soybean oil and menhaden fish oil is 1:1.

1.3 样品的采集和处理

养殖结束时,每个重复取3只鲍,在冰盘上解剖,分离肝胰腺和肾脏,分别放入1.5 mL离心管中,液氮速冻,-80 °C保存。

1.4 实验方法

1.4.1 肝胰腺和肾脏总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

将 Vc 0.0 mg/kg 组和 4 967.5 mg/kg 组各 3 个重复共 9 只皱纹盘鲍的肝胰腺和肾脏分别在液氮中研磨成粉末后,用 Trizol Reagent (Invitrogen) 提取总 RNA,分别混合;用 PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems III (Promega) 纯化 mRNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定所提取的总 RNA 及 mRNA 的完整性,并用 Nano Drop[®] ND-1000 Spectrophotometer 微量紫外/可见分光光度计测定总 RNA 及 mRNA 的浓度。

1.4.2 抑制消减杂交

采用 PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit (Clontech) 进行抑制消减杂交,具体操作按照试剂盒操作说明进行,抑制消减杂交及杂交效率分析过程中所用到的接头和引物序列见表 2。分别以 Vc 0.0 mg/kg 组的肝胰腺和肾脏的 mRNA 作为消减杂交的检验子 (Tester),以 Vc 4 967.5 mg/kg 组的肝胰腺和肾脏的 mRNA 作为驱动器 (Driver)。首先将 Tester 和 Driver mRNA 经 cDNA synthesis primer 反转录成 cDNA 一链,然后合成双链 cDNA。经 *Rsa* I 酶切后,将 Tester cDNA 分别平均分成两份,分别连接 Adaptor 1 和 Adaptor 2R,与过量的 Driver cDNA 进行第一次杂交。混合两份杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA 进行第二次杂交。杂交产物随后用 PCR primer 1 进行抑制 PCR,后用 Nested primer 1 和 2R 进行第 2 次 PCR 扩增。

表 2 抑制消减杂交及消减杂交效率分析中使用的接头和引物序列
Tab. 2 Adaptor and primer sequences used in SSH and subtractive hybridization efficiency

引物名称 Primer	序列 5' -3' Sequences 5' -3'
cDNA synthesis primer	TTTTGTACAAGCTT30N1N
Adaptor 1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT
Adaptor 2R	CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCCGCCGCCGAGGT
PCR primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR primer 1	TCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT
Nested PCR primer 2R	AGCGTGGTCCGCCGCCGAGGT
β -actin F	CGGAGATGGTGTCACCACAC
β -actin R	TTGTATGTGCTCTCGTGATACC

1.4.3 消减杂交效率分析 以 β -actin 基因丰度的变化来反映消减杂交效率。根据皱纹盘鲍 β -actin 基因设计特异引物 β -actin F 和 β -actin R^[10]。分别以肝胰腺和肾脏消减后第 2 次 PCR 产物为模板进行 PCR 扩增。以未经消减杂交的第 2 次 PCR 产物为模板同时进行 PCR 扩增作为对照。反应条件: 94 °C, 30 s; 68 °C, 30 s; 72 °C, 1.5 min; 扩增 33 个循环。分别在第 15、18、23、28 和 33 循环结束后各取 5 μ L 反应产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,检验扩增产物。

1.4.4 消减 cDNA 文库的构建 分别将肝胰腺和肾脏消减后第 2 次 PCR 产物连接到 pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) 中,转化入 JM109 高效感受态细胞

(TaKaRa),菌液均匀涂布在含 X-Gal/IPTG/氨苄青霉素的 LB 培养基上,37 °C 培养 12 h,随机挑取白色克隆,加入到 1 mL LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养 12 h 以上。取培养后的菌液进行菌落 PCR 扩增,反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验。

1.4.5 测序及序列比对 对有插入片段的阳性克隆进行测序(北京华大基因服务公司),测序结果用 BioEdit 软件进行编辑,在 NCBI GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中利用 blast 程序进行同源性的比对分析。然后使用 AmiGo (基于 Gene ontology 数据库, <http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>) 对已知基因按其功能进行分类。

2 结果与分析

2.1 肝胰腺和肾脏组织总 RNA 的提取及 mRNA 纯化

所提取的肝胰腺和肾脏总 RNA 有 28S、18S 和 5S 共 3 条带,条带清晰,边缘锐利(图 1)。 A_{260}/A_{280} 比

值为 1.8 ~ 2.0,说明总 RNA 质量良好,没有降解和污染。分离的 mRNA 表现为 >0.5 kb 拖尾片状条带, A_{260}/A_{280} 比值 >2.0,说明 mRNA 纯度较高,质量良好。

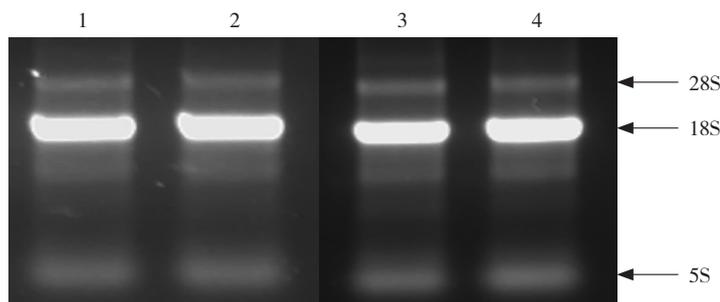


图 1 肝胰腺和肾脏组织总 RNA 1.2% 琼脂糖凝胶电泳图

1: Vc 0.0 mg/kg 处理组肝胰腺总 RNA; 2: Vc 4 967.5 mg/kg 处理组肝胰腺总 RNA; 3: Vc 0.0 mg/kg 处理组肾脏总 RNA; 4: Vc 4 967.5 mg/kg 处理组肾脏总 RNA.

Fig. 1 Total RNA isolated from hepatopancreas and kidney of the abalone *Haliotis discus hannai* Ino

1: Vc 0.0 mg/kg hepatopancreas; 2: Vc 4 967.5 mg/kg hepatopancreas; 3: Vc 0.0 mg/kg kidney; 4: Vc 4 967.5 mg/kg kidney.

2.2 消减杂交效率分析

以肝胰腺未消减的第 2 次 PCR 产物为模板,在 18 循环处出现产物条带;而以消减后的第 2 次 PCR 产物为模板,在 23 循环处才开始出现产物条带,说明 β -actin 基因的丰度大约降低了 2^5 倍(图 2A)。以

肾脏未消减的第 2 次 PCR 产物为模板,在 23 循环处出现产物条带,而以消减后的第 2 次 PCR 产物为模板,在 28 循环处才开始出现产物条带,说明 β -actin 基因的丰度降低了 $2^5 \sim 2^{10}$ 倍(图 2B)。证明消减杂交效率较高。

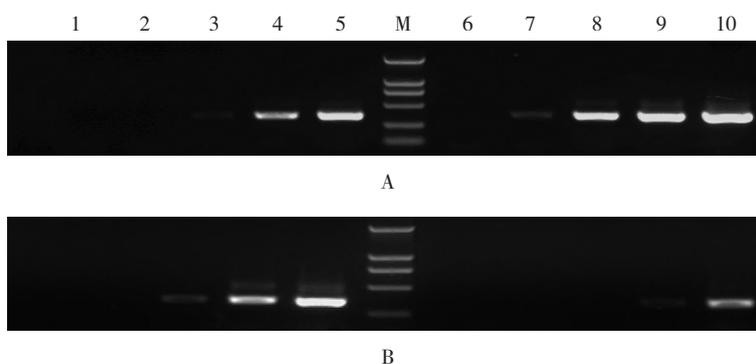


图 2 消减杂交效率分析结果(以皱纹盘鲍 β -actin 基因丰度的变化表示)

A: 肝胰腺 Vc 0.0 mg/kg-Vc 4 967.5 mg/kg (tester: Vc 0.0 mg/kg, driver: Vc 4 967.5 mg/kg); 1-5: 以消减后的第 2 次 PCR 产物为模板; 6-10: 以未消减的第 2 次 PCR 产物为模板. B: 肾脏 Vc 0.0 mg/kg-Vc 4 967.5 mg/kg (tester: Vc 0.0 mg/kg, driver: Vc 4 967.5 mg/kg); 1-5: 以未消减的第 2 次 PCR 产物为模板; 6-10: 以消减后的第 2 次 PCR 产物为模板. 1 和 6: 15 循环; 2 和 7: 18 循环; 3 和 8: 23 循环; 4 和 9: 28 循环; 5 和 10: 33 循环; M: DNA marker.

Fig. 5 PCR analysis of the subtractive hybridization efficiency by β -actin

A: hepatopancreas Vc 0.0 mg/kg-Vc 4 967.5 mg/kg (tester: Vc 0.0 mg/kg, driver: Vc 4 967.5 mg/kg), PCR was performed on subtracted cDNA (1-5) and unsubtracted cDNA (6-10). B: kidney Vc 0.0 mg/kg-Vc 4 967.5 mg/kg (tester: Vc 0.0 mg/kg, driver: Vc 4 967.5 mg/kg), PCR was performed on unsubtracted cDNA (1-5) and subtracted cDNA (6-10). 1 and 6: 15 cycles; 2 and 7: 18 cycles; 3 and 8: 23 cycles; 4 and 9: 28 cycles; 5 and 10: 33 cycles; M: DNA marker.

2.3 差异片段阳性克隆的筛选和测序

在肝胰腺消减 cDNA 文库中, 随机挑取 96 个阳性克隆做菌落 PCR, 得到扩增产物的有 81 个, 产物大小在 0.1 ~ 1.2 kb, 全部送测序(图 3A)。在肾脏消减 cDNA 文库中, 随机挑取 74 个阳性克隆做菌落 PCR, 得到扩增产物的有 60 个, 产物大小在 0.1 ~ 0.7 kb, 全部送测序(图 3B), 测序结果在 NCBI GeneBank 上进行同源性比较。在肝胰腺 Vc 缺乏消减 cDNA 文库中, 送测序的 81 个阳性克隆测序成功 63 个。通过 blast 比对发现已知功能基因 34 个, 占 54.0%, GO (Gene ontology) 按照功能将其分为 4 类: 代谢相关基因 10 个, 包括 α -葡萄糖苷酶、 β -1, 3-D-葡聚糖酶、纤维素酶和藻酸盐裂解酶等, 占 15.9%; 细胞代谢相关基因 19 个, 包括细胞色素 c 氧化酶、类半胱氨酸组织蛋白酶和核糖体蛋白等, 占 30.2%; 生物学调节相关基因 3 个, 包括铁蛋白和补体 C3 前体等, 占 4.8%; 其他功能基因 2 个, 包括发挥细胞粘着作用的糖蛋白 G 等, 占 3.2%。未知功能基因 29 个, 占 46.0% (表 3)。在肾脏 Vc 缺乏消减 cDNA 文库中, 送测序的 60 个有插入片段的阳性克隆测序成功 39 个, 其中已知功能基因 21 个, 占 53.8%, GO 将其分为 3 类: 代谢相关基因 2 个, 包括类胰凝乳蛋白酶和短链脱氢/还原酶, 占 5.1%; 细胞代谢相关基因 11 个, 包括酸式还原酮双加氧酶、葡萄糖 1-脱氢酶

和核糖体蛋白等, 占 28.2%; 生物调节相关基因 8 个, 包括铁蛋白和丝氨酸蛋白酶抑制剂等, 占 20.5%。未知功能基因 18 个, 占 46.2% (表 4)。

3 讨论

抑制消减杂交技术, 是由 Diatchenko 等^[8]于 1996 年结合抑制 PCR (suppression PCR) 技术和消减杂交方法建立起来的筛选未知差异表达基因的技术。它首先经过两轮杂交, 由于杂交过程中高丰度序列退火时产生同源杂交的速度大于低丰度序列, 使原本在丰度上有差异的 cDNA 序列的相对含量趋于一致; 然后利用抑制性 PCR 链内退火优于链间退火的特点, 使两端带有同一接头的非特异表达基因片段在退火时易形成卡状互补结构, 不能有效扩增, 从而达到选择性扩增特异表达基因的目的。SSH 具有快速、灵敏、高效、假阳性率低等优点, 使其成为筛选差异表达基因最快捷有效的手段。应用 SSH 技术已经在水产动物的免疫、营养、发育以及对环境变化的响应等研究中, 克隆出许多重要的差异表达基因^[11-14]。在本研究中, 利用 SSH 技术, 分别成功构建皱纹盘鲍 Vc 缺乏肝胰腺和肾脏消减 cDNA 文库, 并以 β -actin 基因对构建的消减文库进行消减杂交效率分析。结果显示, 经过消减杂交, 皱纹盘鲍肝胰腺和肾脏组织差异表达的基因分别被富集了大约 2^5 和 $2^5 \sim 2^{10}$ 倍。

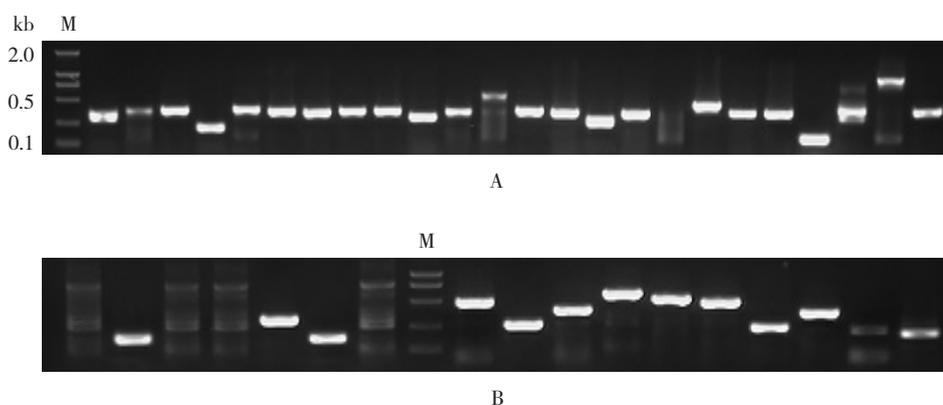


图 3 皱纹盘鲍 Vc 缺乏的消减 cDNA 文库部分菌落 PCR 结果

A: 肝胰腺; B: 肾脏; M: DNA marker; 其他泳道均为阳性克隆菌落 PCR 结果。

Fig. 3 Colony PCR results of some clones in cDNA subtractive library of abalone fed with vitamin C-deficiency diet

A: hepatopancreas; B: kidney. M: DNA marker; other lanes: products of colony PCR.

表3 皱纹盘鲍 Vc 缺乏肝胰腺差异表达 cDNA 文库部分序列同源性比较
 Tab. 3 Sequence identities comparison of the hepatopancreas cDNA subtractive library of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. fed with vitamin C-deficiency diet

Gene ontology 分类 GO annotation: biological process	克隆编号 Clone number	同源性 Homology	物种 Species	预期 Expect (e-value)	同一性/% Identity
1. 代谢 Metabolic process					
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolic process	8/33	β -1,3-D-葡聚糖酶 β -1,3-D-glucanase	扇贝 <i>Chlamys rosealbus</i>	6e-35	45
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolic process	13/14	α -葡萄糖苷酶 α -glucosidase	马 <i>Equus caballus</i>	2e-17	42
碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolic process	42	纤维素酶 Cellulase	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	2e-53	85
蛋白质代谢 Protein metabolic process	31/45	半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Cysteine protease inhibitor	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	2e-06	31
海藻酸代谢 Alginate metabolic process	55/58/60	藻酸盐裂解酶 Alginate lyase	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	3e-31	98
2. 细胞代谢 Cellular metabolic process					
供能及电子传递 Energy and electron transport process	1	细胞色素 c 氧化酶 III Cytochrome c oxidase subunit III	黑鲍 <i>Haliotis rubra</i>	4e-71	95
蛋白质折叠 Protein folding	10	类物质伴侣素 TCP1 Similar to Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	玻璃海鞘 <i>Ciona intestinalis</i>	4e-44	79
细胞自体吞噬 Autophagy	43	类半胱氨酸组织蛋白酶 Cathepsin F-like cysteine protease	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	1e-07	34
翻译 Translation	2/48	40S 核糖体蛋白 RPS24	藻苔藓虫 <i>Flustra foliacea</i>	9e-45	77
翻译 Translation	49	40S 核糖体蛋白 RPS5	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	1e-58	84
翻译 Translation	54/61/63	40S 核糖体蛋白 S7	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	6e-27	88
翻译 Translation	21	核糖体蛋白 L18a	斑点叉尾鲷 <i>Ictalurus punctatus</i>	1e-20	63
翻译 Translation	12	核糖体蛋白 L10	盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	6e-37	98
翻译 Translation	34	核糖体蛋白 L19	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	5e-22	89
翻译 Translation	36	核糖 60S 核糖体蛋白 L12	海湾扇贝 <i>Argopecten irradians</i>	1e-25	86
线粒体 ATP 合成及电子传递 Mitochondrial ATP synthesis coupled elec tron transport	22	Lethal 35Di	日本血吸虫 <i>Schisto soma japonicum</i>	3e-08	32

接上页表 Continued

转录 Transcription	5/11/19 /23/24	发育调节 vdg3 Developmentally-regulated vdg3	贻贝 <i>Mytilus edulis</i>	2e-11	40
3. 生物调节 Biological regulation process					
铁离子平衡调节和运输 Cellular iron ion homeostasis and transport	6/32	铁蛋白 Ferritin	可口革囊星虫 <i>Phascolosoma esculenta</i>	1e-19	69
补体激活 Complement activation	28	补体 C3 前体 Complement C3 precursor	犬 <i>Canis familiaris</i>	6e-08	31
4. 其他 Other process					
细胞粘着 Cell adhesion	41	原钙黏素 gamma 亚基 A Protocadherin gamma subfamily A	小鼠 <i>Mus musculus</i>	7e-11	39
细胞粘着 Cell adhesion	56	糖蛋白 G Thrombospondin	中国对虾 <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	9e-03	33
5. 未知功能 Unknown					
	7	(mutated) I 肿瘤关联抗原 Melanoma associated antigen	人 <i>Homo sapiens</i>	6e-03	37
	9	G110660	果蝇 <i>Drosophila mojavensis</i>	3e-08	44
	18	Theromacin	海兔 <i>Aplysia californica</i>	8e-16	62
	20	poly A 结合蛋白 Poly A binding protein, cytoplasmic	小鼠 <i>Mus musculus</i>	4e-17	77
	22	SJCHGC05498 protein	日本血吸虫 <i>Schistosoma japonicum</i>	3e-08	32
	30	卵黄膜泡状澄清区域蛋白 Vitelline envelope zona pellucida domain 2	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	0.0	100
	37	hypothetical protein BRAFLDRAFT_125500	文昌鱼 <i>Branchiostoma floridae</i>	3e-11	56
	40	Haliotis discus hannai DNA, microsatellite marker Hdh-k282	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	1e-16	91
	46	类肌浆球蛋白 Myosinase-like-I/myosinase-II/myosinase-III	太平洋褶柔鱼 <i>Todarodes pacificus</i>	1e-32	50

表4 皱纹盘鲍维生素C缺乏肾脏差异表达cDNA文库部分序列同源性比较
 Tab. 4 Sequence identities comparison of the kidney cDNA subtractive library of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. fed with vitamin C-deficiency diet

Gene ontology 分类 GO annotation: biological process	克隆编号 Clone number	同源性 Homology	物种 Species	预期 Expect (e-value)	同一性/% Identity
1. 代谢 Metabolic process					
蛋白质代谢 Protein metabolic process	1	类胰凝乳蛋白酶 Chymotrypsin-like protease	红螺鲍 <i>Haliotis rufescens</i>	2e-165	93
氧化还原 Oxidation reduction	26	短链脱氢/还原酶 Short-chain dehydrogenase/reductase	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	1e-33	50
2. 细胞代谢 Cellular metabolic process					
细胞氨基酸合成 Cellular amino acid biosynthetic process	6/38	还原酮双加氧酶 Acireductone dioxygenase family	栗酒裂殖酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	4e-25	53
葡萄糖分解 Glucose catabolic process	13	葡萄糖 1-脱氢酶 Glucose 1-dehydrogenase	嗜酸氧化亚铁硫杆菌 <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	3e-08	50
翻译 Translation	3	核糖体蛋白 S30 Ribosomal protein S30	太平洋牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	7e-28	66
翻译 Translation	5	核糖体蛋白 L18 Ribosomal protein L18	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	0.0	99
翻译 Translation	8	核糖体蛋白 rpL35a Ribosomal protein rpL35a	纽虫 <i>Lineus viridis</i>	3e-34	70
翻译 Translation	9/29	核糖体蛋白 S17 Ribosomal protein S17	文昌鱼 <i>Branchiostoma belcheri</i>	8e-45	83
翻译 Translation	10	核糖体蛋白 rpL7a Ribosomal protein rpL7a	蠕虫 <i>Arenicola marina</i>	3e-24	76
翻译 Translation	19	核糖体蛋白 L32 Ribosomal protein L32	光裸方格星虫 <i>Sipunculus nudus</i>	4e-17	80
翻译 Translation	27	核糖体蛋白 rpL6 Ribosomal protein rpL6	扁犹帝虫 <i>Eurythoe complanata</i>	3e-10	63
3. 生物调节 Biological regulation process					
铁离子平衡调节和运输 Cellular iron ion homeostasis and transport	7/14/17/21/33/35/36	铁蛋白 Ferritin	可口革囊星虫 <i>Phascolosoma esculenta</i>	2e-18	72
细胞凋亡诱导 Induction of apoptosis	23	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Kazal-type serine proteinase inhibitor	栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	8e-03	44
4. 未知功能 Unknown					
	2	Raminin receptor	盘鲍 <i>Haliotis discus discus</i>	2e-118	100
	4/12/15/16/18/25/ 28/30/32/37/39	精子溶解酶 Sperm lysin	皱纹盘鲍 <i>Haliotis discus hannai</i>	0.0	99

本研究在肝胰腺Vc缺乏消减cDNA文库中,共获得皱纹盘鲍基因片段63个,其中6个为NCBI GenBank数据库中已知的皱纹盘鲍基因序列,包括3个藻酸盐裂解酶,1个卵黄膜泡状澄清区域蛋白,1个微粒体标记Hdh-k282和1个纤维素酶。其余的57个片段为首次在皱纹盘鲍中发现。在肾脏Vc缺乏消减cDNA文库中,共获得基因片段39个,其中12个基因为已知的皱纹盘鲍基因序列,包括11个精子溶解酶和1个核糖体蛋白L18。其余的27个片段为首次在皱纹盘鲍中发现。这些序列的发现,大大丰富了皱纹盘鲍基因数据,为今后的进一步研究奠定了基础。但是,这些基因片段大多较短,有很多序列在NCBI GenBank数据库中找不到相似的序列,其功能尚无法确定,需要进一步扩增其全长序列,确定其编码的蛋白及功能。尽管有报道称SSH技术在筛选差异表达基因中的阳性率可达94%以上^[9],但通常由于mRNA质量,消减杂交效率,PCR扩增效率等的影响而存在假阳性的可能。因此,所获得的基因是否在Vc缺乏的皱纹盘鲍中高表达还有待进一步验证。

从文库中获得的差异表达基因片段中代谢和细胞代谢相关的基因比例最高,在肝胰腺和肾脏文库中分别占46.1%和33.3%,证明Vc对皱纹盘鲍的代谢具有较大影响。Vc的生物合成是一个复杂的生化反应过程,有多种酶类参与其中。合成途径的起始点在UDP-D-葡萄糖。UDP-D-葡萄糖C-6位置被氧化形成UDP-葡萄糖醛酸。UDP被移除,释放葡萄糖醛酸或葡萄糖醛酸-3,6-内酯。D-葡萄糖醛酸或内酯在C-1位置被还原形成L-古洛糖酸或L-古洛糖酸-1,4-内酯。L-古洛糖酸-1,4-内酯在C-2位置被氧化,形成2-酮-L-古洛糖酸-1,4-内酯,自然烯醇化形成L-抗坏血酸^[15]。在两个消减文库中均没有获得Vc合成途径中相关酶的基因。但从肝胰腺消减文库中获得的细胞色素c氧化酶(表3)以及从肾脏消减文库中获得的葡萄糖-1-脱氢酶(表4)基因,已经被证明在动物Vc合成过程中参与电子传递,对Vc的合成起重要的辅助作用^[16-17]。

α -葡萄糖苷酶可从低聚糖类底物的非还原末端切开 α -1,4糖苷键,释放出葡萄糖^[18],对软体动物糖原的降解和葡萄糖的消化吸收都具有重要促进作用^[19]。藻食性海洋无脊椎动物消化液中存在大量不同种类的多糖分解酶,包括 β -1,3-D-葡聚糖酶,纤维素酶以及藻酸盐裂解酶等,可裂解藻类中的多糖为寡聚糖和单糖作为动物碳和能量的来源^[20-21]。以上这些与碳水化合物消化吸收和代谢相关的酶的基因均从肝胰腺Vc缺乏消减文库中获得(表3)。在哺乳动物中,已证明Vc生物合成与糖代谢存在密切联系:Vc生物合成的底物为UDP-D-葡萄糖^[15],Vc合成能力的提高依赖于可利用葡萄糖含量的增加。Vc合成和肝脏抗坏血酸含量在摄食缺乏碳水化合物饲料的大小鼠中均有明显下降^[22-23],并且肝糖耗尽的鼠肝实质细胞几乎失去了抗坏血酸合成能力^[24];而通过不同种类的物质或其他途径刺激肝糖的分解,以及增加UDP-葡萄糖含量会增强肝实质细胞中抗坏血酸的合成速率^[24-25]。由此推测,在Vc缺乏时,皱纹盘鲍会提高自身Vc合成能力以满足需要,而Vc合成的增加需要更多的可利用葡萄糖作为底物,从而对肝胰腺中碳水化合物消化吸收和代谢相关的基因产生影响。

铁蛋白是动物体内普遍存在的铁储存蛋白^[26]。已有的研究证明Vc能够增强哺乳动物对食物中铁的吸收和改善铁储存,如患坏血病的豚鼠其脾脏和肝脏中铁蛋白浓度下降^[27],Vc能够抑制白血球、红血球中铁蛋白的分解^[28],能够提高晶状体上皮细胞中铁蛋白的含量、提高铁蛋白mRNA的转录和翻译水平^[29]。有几个研究证明增加细胞铁蛋白含量能有效保护细胞免受H₂O₂的伤害^[30-32]。动物Vc合成过程中会产生与Vc等量的H₂O₂^[15],Vc合成能力的提高可能需要更多的铁蛋白以抵御其造成的氧化胁迫伤害。在本研究中,从Vc缺乏的皱纹盘鲍肝胰腺和肾脏消减cDNA文库中都获得了铁蛋白基因(表3、4),证明Vc缺乏会影响铁蛋白的代谢,但铁蛋白在皱纹盘鲍Vc缺乏时的生理功能还有待进一步研究。

总之,本研究通过构建皱纹盘鲍肝胰腺和肾脏

消减cDNA文库,获得了Vc缺乏条件下差异表达的基因,并对其功能进行了初步的分析和分类。结果证明,Vc缺乏对皱纹盘鲍的代谢具有较大影响。虽然无论从肝胰腺还是肾脏消减文库中均未获得Vc合成途径中的酶的基因,未能获得皱纹盘鲍具有Vc合成能力的直接证据,但获得了细胞色素c氧化酶和葡萄糖-1脱氢酶等与供能和电子传递相关的酶, α -葡萄糖苷酶、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶和藻酸盐裂解酶等与碳水化合物代谢相关的酶以及铁蛋白等在其他动物中被证明与Vc合成相关的基因,为进一步研究皱纹盘鲍Vc合成和代谢奠定了基础。同时,在本研究中获得到了大量未知功能基因,在肝胰腺和肾脏消减文库中分别占46.0%和46.2%。这些未知基因的功能及在皱纹盘鲍Vc代谢中发挥的作用有待于进一步研究确定。

参考文献:

- [1] Gershoff S N. Vitamin C (ascorbic acid) new roles, new requirements? [J] Nutrition Review, 1993, 51: 313-326.
- [2] Arrigoni O, De Tullio M C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2002, 1569: 1-9.
- [3] 陈建明,叶金云,潘茜,等. 饲料中添加维生素C对翘嘴鲌鱼种生长及组织中抗坏血酸含量的影响[J]. 中国水产科学, 2007, 14(1): 106-112.
- [4] Ai Q, Mai K, Zhang C, et al. Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* [J]. Aquaculture, 2004, 242: 489-500.
- [5] Ai Q, Mai K, Tan B, et al. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* [J]. Aquaculture, 2006, 261: 327-336.
- [6] Xie Z, Niu C, Zhang Z, et al. Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*), a species capable of ascorbic acid biosynthesis [J]. Compar Biochem Physiol, Part A, 2006, 145: 152-157.
- [7] Mai K. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone, *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino.: VII. Effects of dietary vitamin C on survival, growth and tissue concentration of ascorbic acid [J]. Aquaculture, 1998, 161: 383-392.
- [8] Diatchenko L, Chris Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [9] Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Research, 1997 25: 2598-2602.
- [10] Ma H, Xu w, Mai K, et al. Cloning and characterization of an abalone (*Haliotis discus hannai*) actin gene [J]. J Ocean Univ China, 2004, 3(2): 145-149.
- [11] 王传娟,张晓华,贾爱荣. 抑制性消减杂交技术在养殖鱼类免疫基因克隆中的应用[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 504-512.
- [12] 刘晶,张文兵,麦康森,等. 皱纹盘鲍外套膜耐维生素E缺乏消减cDNA文库的构建[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 383-389.
- [13] Xu W, Faisal M. Development of a cDNA microarray of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) foot and its use in understanding the early stage of underwater adhesion [J]. Gene, 2009, 436: 71-80.
- [14] Boutet I, Tanguy A, Moraga D. Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions [J]. Gene, 2004, 329: 147-157.
- [15] Smirnoff N. L-Ascorbic Acid Biosynthesis [J]. Vitam Horm, 2001. 61: 241-266.
- [16] Hollman S, Touster O. Alterations in tissue levels of uridine diphosphate glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid pyrophosphatase and glucuronyl transferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1962, 26: 338-352.
- [17] York J L, Grollman A P, Bublitz C. TPN-L-gulonate dehydrogenase [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1961, 47: 298-306.
- [18] Chiba S. α -Glucosidase. Handbook of Amylases and Related Enzymes [M]. Oxford: The Amylase Research Society of Japan/ Pergamon Press, 1988: 104-116.
- [19] Andreotti G, Giordano A, Tramice A, et al. Hydrolyses and transglycosylations performed by purified α -D-glucosidase of the marine mollusc *Aplysia fasciata* [J]. J Biotechnol, 2006, 122: 274-284.
- [20] Takami H, Kawamura T, Yamashita Y. Development of polysaccharide degradation activity in postlarval abalone *Haliotis discus hannai* [J]. J Shellfish Res, 1998, 17: 723-727.
- [21] Johnston D, Moltschanivskyj N, Wells J. Development of the radula and digestive system of juvenile blacklip abalone (*Haliotis rubra*): potential factors responsible for variable weaning success on artificial diets [J]. Aquaculture, 2005, 250: 341-355.
- [22] Rojas C, Cadenas S, Perez Campo R, et al. Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice [J]. Arch Biochem Bioph, 1993, 306: 59-64.

- [23] Stirpe F, Comporti M. Regulation of ascorbic acid and of xylulose synthesis in rat-liver extracts [J]. *Biochem J*, 1965, 95: 354–362.
- [24] Braun L, Garzo' T, Mandl J, et al. Ascorbic acid synthesis is stimulated by enhanced glycogenolysis in murine liver [J]. *FEBS Letters*, 1994, 352: 4–6.
- [25] Braun L, Csala M, Poussu A, et al. Glutathione depletion induces glycogenolysis dependent ascorbate synthesis in isolated murine hepatocytes [J]. *FEBS Letters*, 1996, 388: 173–176.
- [26] Theil E C. Ferritin : structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms [J]. *Ann Rev Biochem*, 1987, 56: 289–315.
- [27] Lipschitz D A, Bothwell T H, Seftel H C, et al. The role of ascorbic acid in the metabolism of storage iron [J]. *Brit J Haematol*, 1971, 20: 155–163.
- [28] Bridges K R. Ascorbic acid inhibits lysosomal autophagy of ferritin [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 14773–14778.
- [29] Goralska M, Harned J, Grimes A M, et al. Mechanisms by which Ascorbic Acid Increases Ferritin levels in Cultured Lens Epithelial Cells [J]. *Experim Eye Res*, 1997, 64: 413–421.
- [30] Jacob B G, Balla H S, Rosenberg J, et al. Ferritin : a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium [J]. *J Biol Chem*, 1992a, 267: 18148–18153.
- [31] Jacob B G, Balla H S, Nath G, et al. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction by heme proteins : a possible mechanism limiting shock damage [J]. *Trans Associat Am Phys*, 1992b, 105: 1–6.
- [32] Balla C J, Jacob J, Balla H S, et al. Tumor cell heme uptake induces ferritin synthesis resulting in altered oxidant sensitivity: possible role in chemotherapy efficacy [J]. *Can Res*, 1993, 53: 5308–5313.

Construction of the hepatopancreas and kidney cDNA subtractive library of abalone *Haliotis discus hannai* Ino. fed with vitamin C-deficiency diet

WANG Jia, MA Hongming, MAI Kangsen, ZHANG Wenbing, LIUFU Zhiguo

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The study was conducted to clone the differentially expressed genes in hepatopancreas and kidney of abalone (*Haliotis discus hannai* Ino.) under vitamin C deficiency. Abalone, initial body weight (74.32 ± 0.43) g, initial shell length (84.36 ± 0.24) mm, were fed 170 d with purified diets containing 2 levels of vitamin C at 0 mg/kg and 4 967.5 mg/kg. cDNA subtractive libraries of hepatopancreas and kidney of abalone vitamin C deficiency-treated were constructed using the method of suppression subtractive hybridization (SSH). Subtraction efficiencies were about 2^5 and 2^5-2^{10} -fold enrichment in hepatopancreas and kidney cDNA subtractive library respectively. Positive clones were randomly selecte and sequenced. Sixty three clones from hepatopancreas cDNA subtractive library were sequenced. The sequences were subjected to GO annotation. According to their physiological function, they could be subdivided into 4 categories: 15.9% of metabolic processes genes, 30.2% of cellular metabolic processes genes, 4.8% of biological regulation genes, 3.2% of other functions genes, and unknown genes. Thirty nine cDNA fragments from kidney cDNA subtractive library were sequenced, and they could be subdivided into 3 categories: 5.1% of metabolic processes genes, 28.2% of cellular metabolic processes genes, 20.5% of biological regulation genes, and 46.2% unknown genes. A series of genes related to vitamin C biosynthesis have been obtained in this study, which includes cytochrome c oxidase, glucose 1-dehydrogenase, α -glucosidase, β -1,3-D-glucanase, cellulase, alginate lyase and ferritin. This research provides the basic data to further study the biosynthesis and metabolism of vitamin C in abalone. [*Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 619–629]

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino.; hepatopancreas; kidney; vitamin C; suppression subtractive hybridization; subtractive cDNA library.

Corresponding author: MAI Kangsen. E-mail: kmai@ouc.edu.cn