

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00379

红笛鲷头肾消减 cDNA 文库的构建与分析

张新中^{1, 2, 3, 4}, 吴灶和^{3, 4}, 简纪常^{3, 4}, 鲁义善^{3, 4}

1. 中国科学院 南海海洋研究所, 广东 广州 510301;
2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049;
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 524025;
4. 广东省教育厅水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025

摘要: 应用抑制性消减杂交技术 (SSH) 构建红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*)头肾消减 cDNA 文库, 筛选红笛鲷免疫相关基因的 EST。以哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 灭活疫苗体内诱导红笛鲷为实验组, 以注射无菌生理盐水的红笛鲷为驱动组, 通过 SSH 技术构建红笛鲷头肾消减 cDNA 文库。利用 PCR 技术和斑点杂交对文库进行筛选, 从 2 424 个含插入片段的阳性克隆中筛选了 680 个克隆在上海生工进行了序列测定。使用 BLASTx 和 BLASTn 工具对获得的 ESTs 与 GenBank 数据库进行同源性比较并根据相似性序列的名称通过 GO 法对 ESTs 进行注释。结果获得了 30 个与红笛鲷免疫防御相关基因的 EST, 如组织相容性抗原复合物基因 (*MHC I* 和 *MHC II*)、免疫球蛋白基因 (IgH 和 IgL)、热休克蛋白基因 (HSP10、HSP70 和 HSP90) 等。本研究构建了哈氏弧菌灭活疫苗免疫后与正常组织差异表达的消减 cDNA 文库, 并获得一批与红笛鲷免疫防御相关的 ESTs, 旨在为探讨红笛鲷分子免疫防御机制、筛选参与免疫防御调控相关的功能基因, 揭示红笛鲷免疫抗病机制、提高机体抗病力、实现遗传改良奠定基础。[中国水产科学, 2011, 18(2): 379–391]

关键词: 红笛鲷; 抑制性消减杂交技术; cDNA 文库; 免疫基因

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)02-0379-13

1996 年, Diatchenko 等^[1]建立了一种新的 cDNA 消减杂交方法称为抑制消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH), 用于分离 2 个群体间差异表达的基因。它克服了 DDRT-PCR 法的假阳性较高和 RDA 法消减杂交轮次较多的缺点^[2], 非常适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能研究, 成为差异表达基因筛选的最有潜力的方法。目前, SSH 技术已多次应用鱼类特定功能基因的研究。如 Bayne 等^[3]利用 SSH 技术成功构建了虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 消减 cDNA 文库并分离多种免疫相关基因序列。国内张义兵等^[4]成功构

建了草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 消减 cDNA 文库, 并从文库中分离鉴定出包括 *Stat1*、*Jak1*、*Mx*、*Viperin*、*IRF* 和 *TLR3* 等抗病毒或免疫相关基因在内的 69 个 ESTs。

对免疫系统的研究表明, 鱼类作为低等脊椎动物, 具有先天性和获得性的免疫, 同源于哺乳动物的免疫系统。免疫系统在鱼类抵抗疾病、适应外界环境等方面有重要的作用。因此克隆编码免疫系统的基因, 是研究鱼类基因工程疫苗, 提高鱼类适应能力, 抵抗疾病, 从而增高存活率的一个重要步骤^[5]。目前, 已有多种鱼类免疫防御相关基因研究的报道, 如热休克蛋白家族基因^[6-7],

收稿日期: 2010-05-16; 修订日期: 2010-06-11.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40906073); 广东省科技厅国际合作项目(2009B050700040).

作者简介: 张新中(1981-), 男, 博士研究生, 主要从事水生生物病害防治的研究. E-mail: zxzlyg@yahoo.com.cn

通讯作者: 吴灶和, 男, 研究员, 博士生导师. E-mail: wuzh@gdou.edu.cn

组织相容性复合物基因^[8]、免疫球蛋白基因及凝集素基因^[9]等, 它们能参与一系列重要的细胞进程。如 HSP90 基因在细胞保护^[10], 细胞凋亡^[11]及细胞分化^[12]等方面发挥重要作用。因此, 进一步研究鱼类免疫相关基因并阐明其功能, 对于了解鱼类的耐受机制与环境胁迫间的关系及有效控制病害的发生大有帮助。

红笛鲷(*Lutjanus sanguineus*), 又名红鱼, 是中国南方沿海的重要经济鱼类之一。近年来, 海南、湛江等地养殖水域的红鱼频繁暴发由哈氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 引发的烈性传染疾病, 给养殖户带来巨大经济损失。然而, 有关红笛鲷免疫防御机制, 特别是分子免疫防御机制和免疫相关功能基因的研究尚为鲜见。本研究应用 SSH 技术成功构建了哈氏弧菌灭活疫苗体内诱导的红笛鲷头肾消减 cDNA 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, 为进一步克隆红笛鲷相关功能基因及研究哈氏弧菌感染后相关功能基因的组织表达差异提供背景资料。同时, 这也为探讨红笛鲷分子免疫防御机制、筛选参与免疫防御调控相关的功能基因, 揭示红笛鲷免疫抗病机制、提高机体抗病力、实现遗传改良奠定基础^[13]。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用红笛鲷采集自湛江港某鱼排, 个体质量 15 g 左右, 健康、有活力。充氧运至实验室后暂养于含 80~100 L 沙滤海水的水族箱中, 每箱 10 尾, 水温(28±1)℃。每日下午投喂小杂鱼肉糜一次, 日换水量为 20~30 L。暂养 7 d 后用于实验研究。

实验用哈氏弧菌强毒株分离自湛江港某鱼排患病红笛鲷, LD₅₀ 为 7.2×10⁵ cfu/g。保存于本实验室。

红笛鲷 β -actin 基因的特异性引物序列由本实验室提供并由上海生工合成。上游引物 F1 序列为 5'-GCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGA-3',

下游引物 R1 序列为 5'-CGCCTGAGTGTGTAT GAGAAATG-3'。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司; PCR Select TMcDNA Subtraction Kit 购自 Clontech 公司; PolyATtract [®] mRNA Isolation Systems III 购自 Promega 公司; QIAquick TM PCR Purification Kit 购自 QIAGEN 公司; pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司; DIG DNA 标记试剂盒 II 购自 Labkit 公司; 地高辛杂交检测试剂盒 I 购自 Labkit 公司。

1.2 哈氏弧菌灭活疫苗的制备

将保种的哈氏弧菌以 1:50 的体积比加入到含 200 mL TSB 培养基的 1 000 mL 锥形瓶中, 180 r/min 28℃ 扩大培养 16~18 h。取 1mL 用于平板菌落计数, 其余菌液加入福尔马林至终浓度为 0.3%, 于 28℃ 灭活 48 h, 经灭活检验和安全性检验后根据细菌浓度离心浓缩为 1×10⁹ cfu/mL, 4℃ 保存备用。

1.3 红笛鲷免疫实验

采用腹腔注射法免疫红笛鲷。实验组 8 尾红笛鲷哈氏弧菌灭活疫苗体内诱导量为 100 μ L/尾, 驱动组 8 尾红笛鲷注射无菌生理盐水 100 μ L/尾。诱导 20 h 后活体解剖取头肾为材料提取总 RNA。

1.4 总 RNA 提取与 mRNA 的分离纯化

按照 Trizol 试剂盒的方法分别提取 tester 和 driver 的总 RNA, 在 1.0 % 的琼脂糖凝胶上电泳检测其完整性。按照 PolyATtract [®] mRNA Isolation Systems III 的试剂盒的方法从总 RNA 中分离提纯 mRNA, 真空冷冻干燥后用溶于 6 μ L RNase-free 水中。取 1 μ L 在 1.0 % 的琼脂糖凝胶上电泳检测其完整性, 紫外分光光度计检测其浓度。用 RNase-free 水将 mRNA 的终质量浓度调整到 0.5 μ g/ μ L, -70℃ 保存。

1.5 SSH 文库的构建

1.5.1 抑制消减杂交 具体操作依照 Clontech 公司的消减杂交试剂盒(PCR Select TM cDNA Subtraction Kit)的说明书进行。以哈氏弧菌灭活疫苗体内诱导红笛鲷为消减杂交的实验组(tester), 以注射无菌生理盐水的红笛鲷为驱动组(driver)

进行消减杂交。简言之, 分别将 tester 和 driver 的 mRNA 反转录合成 cDNA 第一链, 并立即合成 cDNA 第二链。用 *Rsa*I 对等量的 tester 和 driver 进行内切酶消化, 产生较短的平端片段; 然后将 tester 样本经 *Rsa*I 酶切后的 cDNA 片段分为 2 份, 分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 adaptor 1 和 adaptor 2R, 然后与过量的 driver cDNA 片段杂交孵育; 合并两种杂交产物后再与 driver cDNA 作第 2 次杂交, 具有差异表达的序列片段可以作为 PCR 扩增的模板。

1.5.2 接头连接效率检测 以管家基因 β -actin 为指标检测 tester cDNA 的接头连接效率。以 β -actin 基因上游引物 F1 和下游引物 R1 为一个组合, 以试剂盒提供的接头引物 PCR Primer 1(5'-CTAATACGACTCACTATAAGGGC-3') 和 β -actin 基因下游引物 R1 为一个组合进行 PCR 扩增, 比较不同引物组合扩增产物的大小及产量, 鉴定连接效率。反应条件为: 94℃ 5 min; 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min; 扩增 25 个循环。

1.5.3 消减效率检测 为了检测红笛鲷头肾消减 cDNA 文库的消减效率, 选用管家基因 β -actin 作为检测指标, 以消减 cDNA 和未消减 cDNA 为模板, β -actin 的特异引物进行 PCR 扩增, 比较它们在经过消减和未经过消减杂交中的丰度的相差倍数, 以估计消减杂交效率。引物序列及 PCR 反应条件同 1.5.2, 循环数为 18~33 个。

1.5.4 PCR 产物的分子克隆 消减杂交之后, 用接头上特异性的 PCR 引物对待测 cDNA 进行 PCR 扩增, 使 tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。基于 PCR 抑制效应, 经过两轮 PCR 扩增, 只有那些片段两端分别是 adaptor1 和 adaptor 2R 的具有差别表达的片段才能以指数级扩增, 并减少非特异性扩增。富积的消减 cDNA 片段经 PCR 扩增后, 用 PCR 产物纯化试剂盒(QIAquick™ PCR Purification Kit)进行纯化浓缩, 产物连入 pMD18-T 载体, 转化至 DH5 α 感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/

X-gal/ IPTG 平板上 37℃ 过夜培养。挑取白色克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基中 37℃ 220 r/min 培养 3 h 用于 PCR 扩增。

1.5.5 消减 cDNA 阳性克隆的筛选

(1) PCR 筛选管理 取 1 μ L 菌液作模板, 以消减杂交试剂盒提供的 Nested Primer 1(5'-TCGA GCGGCCGCCGGGCAGGT-3') 和 Nested Primer 2R(5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') 为引物, PCR 鉴定插入片段大小; PCR 反应条件如下: 94℃ 变性 5 min, 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环后取 5 μ L PCR 产物电泳检测; 弃阴性克隆、多克隆和片段小于 150 bp 的阳性克隆。对符合条件的阳性克隆进行斑点杂交筛选。

(2) 斑点杂交筛选

A. 制备消减 cDNA 文库探针和驱动 cDNA 文库探针。分别取经过消减杂交的 cDNA(以实验组头肾组织制备的 tester, 以驱动组头肾组织制备 driver)和 driver cDNA 同样通过连接接头、但不经消减杂交直接按 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtractive Kit 说明书进行两轮 PCR 的产物各 100 μ L, 直接加入 12 μ L *Rsa*I 缓冲液, 3 μ L *Rsa*I(30 u), 37℃ 完全酶切; 酶切产物用等体积酚+氯仿+异戊醇(体积比 25:24:1)混合液抽提一次, 氯仿+异戊醇(体积比 24:1)混合液抽提 1 次; 然后加入 1/10 体积的 3 mol/L NaOAc, 2.5 倍体积的无水乙醇, 12 000 g 离心 20 min 沉淀 DNA; 然后分别加入 16 μ L 无菌水溶解 cDNA。cDNA 文库探针标记的具体步骤参照 DIG DNA 标记试剂盒 II 说明书进行。

B. 斑点杂交筛选阳性克隆。分别取 3 μ L Nested Primer 1 和 Nested Primer 2R 的 PCR 产物与 3 μ L 新鲜配制的 0.6 mol/L NaOH 混匀变性, 在两张正电荷尼龙膜上相同的位置点样 1 μ L 混合液。杂交、洗膜的具体步骤参照地高辛杂交检测试剂盒 I 说明书进行。比较用 2 种探针标记杂交的两张膜, 根据两者对应位置之间显色的差异, 视杂交信号仅在用消减 cDNA 文库探针杂交时出现、或信号强度明显高于用驱动组 cDNA

文库探针者为阳性克隆用于测序。

1.6 测序及序列分析

将筛选出的阳性克隆菌株送至上海生工生物工程有限公司进行测序。利用 Genetyx 软件扫描测序所得的全部 EST 序列, 去除其中载体及引物序列; 使用软件 DNAMAN 5.2.2 对全部有效的 EST 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 和 BLASTn 工具对获得的 Contigs 和 Singletons 与 GenBank 数据库进行同源性比较(E -value 1×10^{-5} , Identity 40% 视为相似性显著), 并根据相似性序列的名称, 通过 GO 法 (Gene Ontology) 对 ESTs 序列进行注释并分类。应用 SignalP v3.0 程序和隐马可夫模型 (HMM) 程序预测蛋白信号肽; 利用 TMHMM v2.0 程序对含信号肽的 EST 进行蛋白跨膜结构域分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 与 mRNA 的质量检测

紫外分光光度计检测驱动组和实验组红笛鲷总 RNA, 二者的 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 比值分别为 1.86 和 1.81; 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测其完整性(图 1), 可见在 18S 和 28S 区域有明显的条带, 说明其完整性良好, 可进一步用于纯化 mRNA。用同样方法检测驱动组和实验组红笛鲷 mRNA, 二者的 OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 比值分别为 1.78 和 1.86, 纯化的 mRNA 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上呈弥散状

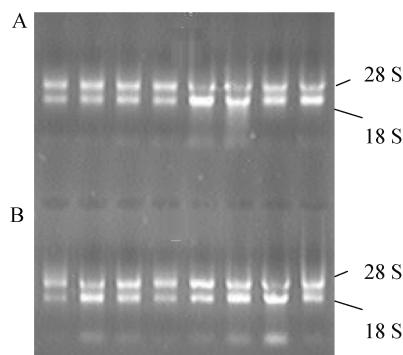


图 1 总 RNA 的质量检测电泳图

A 为实验组检测结果; B 为驱动组检测结果。

Fig. 1 Quality analysis electrophoretogram of total RNA
A: the result of tester; B: the result of driver.

(图 2), 证明质量良好, 可用于构建文库。

2.2 连接效率的检测

加接头的目的是在消减杂交之后可以用特异的引物 PCR 扩增差异表达的基因, 使差异表达基因、特别是稀有表达的差异基因得到富集, 因此是非常关键的一步。电泳检测显示了 tester-1 cDNA 和 tester-2R cDNA 的接头连接效率(图 3)。1、3 泳道用 adaptor1 和 adaptor2R 的共有序列的引物 PCR Primer1 以及 β -actin 的下游引物。2、4 泳道用 β -actin 的上游和下游引物。如果连接成功, 则 1、3 泳道的 PCR 产物将大于 2、4 泳道。图 3 可见, 1、3 泳道产物亮度与 2、4 泳道产物相差不大,

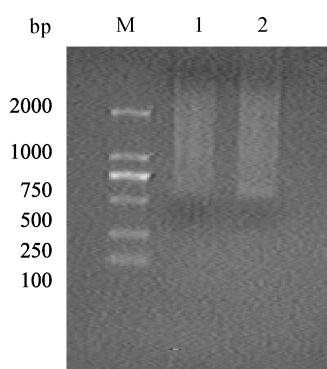


图 2 mRNA 的质量检测电泳图

1 为实验组检测结果; 2 为驱动组检测结果; M 为 DNA 分子量标记 DL2000.

Fig. 2 Quality analysis electrophoretogram of mRNA
1: the result of tester; 2: the result of driver; M: DNA Marker DL2000.

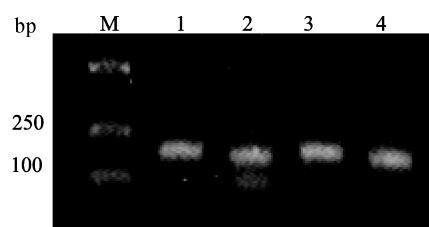


图 3 Tester-1 cDNA 和 Tester-2R cDNA 接头连接效率的 PCR 检测结果

M: DNA 分子量标记 DL2000; 1 和 3 泳道为 PCR Primer1 和 β -actin 的下游引物的 PCR 结果; 2 和 4 泳道为 β -actin 的上游和下游引物的 PCR 结果。

Fig. 3 Results of the adaptor ligation efficiency analysis by PCR using tester-1 cDNA and tester-2R cDNA as templates M: DNA Marker DL2000. Lanes 1 and 3: PCR products are generated by PCR primer1 and downstream primer of β -actin. Lanes 2 and 4: PCR products are generated by upstream and downstream primers of β -actin.

表明 2 种引物组合的 PCR 产量相近。以上结果显示接头连接效率较高。

2.3 文库的消减效率检测

为了检测头肾相关基因在消减 cDNA 文库中的消减效率, 以管家基因 β -actin 作为检测指标, 通过比较它们在经过消减和未经消减杂交的 cDNA 中丰度的相差倍数, 以估计消减杂交效率。以没有经过消减的 cDNA 为模板, β -actin 基因在 18 个循环即可扩增较强的带, 因此对于 β -actin 基因, 消减杂交将其减弱了至少数十倍。反过来表明消减杂交可能将某些特有的差异表达的 cDNA 富集了同样的倍数, 但是, 不同的基因富集的倍数可能不相同(图 4)。

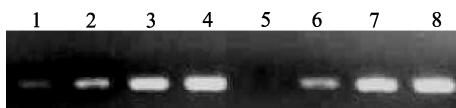


图 4 cDNA 文库消减效率的 PCR 检测结果
以未作消减的 cDNA(泳道 1~4)和消减的 cDNA(泳道 5~8)为模板, β -actin 的上下游引物进行 PCR 扩增。1 和 5 泳道: 18 个循环; 2 和 6 泳道: 23 个循环; 3 和 7 泳道: 28 个循环; 4 和 8 泳道: 33 个循环。

Fig. 4 PCR results of subtractive efficiency of cDNA library
PCR amplification was performed on unsubtracted cDNA(Lanes 1~4)and subtracted cDNA(Lanes 5~8)using the primers of β -actin. Lanes 1 and 5: 18 cycles; Lanes 2 and 6: 23 cycles; Lanes 3 and 7: 28 cycles; Lanes 4 and 8: 33 cycles.

2.4 消减 cDNA 片段的 PCR 筛选

将利用抑制性消减技术获得的消减 cDNA 片段连接到 pMD18-T 载体得到了消减 cDNA 片段的质粒文库。随机挑选白色菌落进行 PCR 筛选, 弃阴性克隆、多克隆及片段小于 150 bp 的克隆, 得到了 PCR 产物为单一一条带的有效克隆 2 424 个, 其插入 cDNA 片段的大小在 0.15~1.0 kb(图 5)。

2.5 消减 cDNA 片段的斑点杂交筛选

将 2 424 个克隆的 PCR 产物用消减 cDNA 文库探针和未经消减的驱动组 cDNA 文库探针进行杂交。取杂交信号仅在用消减 cDNA 文库探针杂交时出现、或信号强度明显高于驱动组 cDNA 文库探针者为阳性克隆用于测序, 杂交结果见图 6。

2.6 EST 测序、拼接及注释

经过 5' 端测序、去除低质量序列、载体序列和小于 150 bp 的序列后, 共得到 587 条高质量的 EST 序列, 其平均序列长度为 272 bp。BLASTx 和 BLASTn 同源性分析表明, 386 条 EST 序列与 NCBI 数据库中的已知序列存在显著的相似性, 201 条 ESTs 无显著同源性。587 条 EST 序列经过软件 DNAMAN5.2.2 拼接后共得到 272 条单基因簇, 其中 158 条单基因簇 (36 个重叠序列和 122 条单一序列) 存在 BLAST 显著同源性, 114 条单基因簇无显著同源性。通过 BLASTx 和 BLASTn

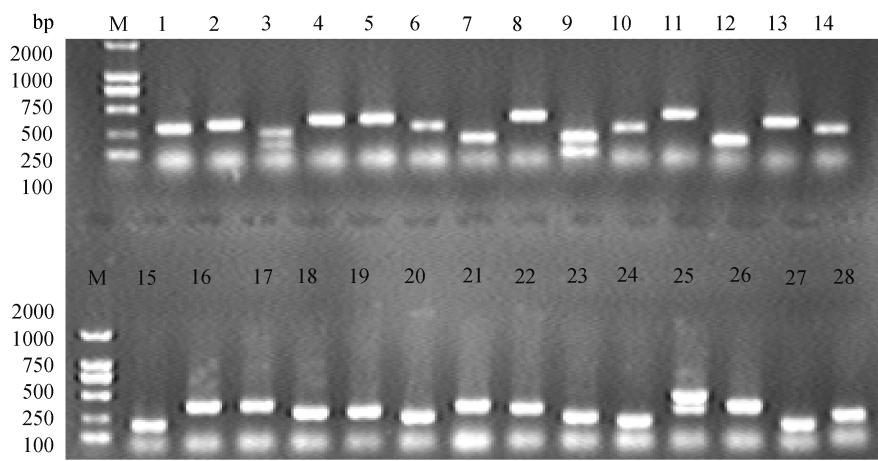


图 5 消减文库中含 cDNA 片段克隆的 PCR 筛选结果
M: DNA 分子量标记 DL2000. 1~28: 菌落 PCR 鉴定结果.
Fig. 5 Screen of colonies with cDNA fragments from subtractive cDNA library by PCR
M: DNA Marker DL2000. 1~28: PCR results of colony identification.

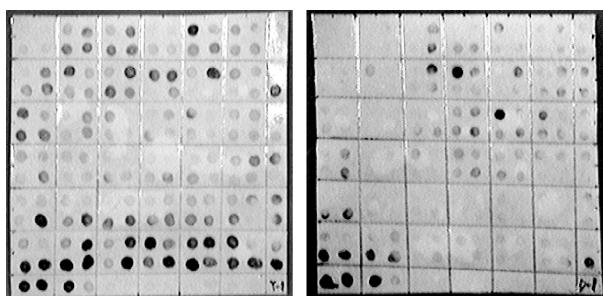


图 6 差异 cDNA 的斑点杂交筛选结果
左: 消减 cDNA 文库探针杂交结果; 右: 未消减 cDNA 文库探针杂交结果。

Fig. 6 Results of dot blot analysis from subtractive cDNA library
Left: results of subtractive cDNA library hybridization;
Right: results of driver cDNA library hybridization.

搜索比对, 总共 158 个单基因簇(386 个 EST) 获得了基因名称, 其中和公共数据库 nr 库比对上的有 137 个, 和 nt 库比对上的有 21 个, 共占总数的 58.1%, 没有比对上的有 114 个, 占总数的 41.9%。通过 GO 法 (Gene Ontology) 对获得的 158 条单基因簇基因进行注释, 其中 21 条单基因簇为未知功能基因。对余下的 137 条单基因簇按注释结果分类发现, 免疫防御相关蛋白基因最多, 有 30 种; 其次为细胞周期/DNA 复制/蛋白调控/转录/翻译相关蛋白基因, 共 29 种。细胞代谢/呼吸链相关蛋白及核糖体蛋白基因数量分别为 26 和 24。数量最少的是转运相关蛋白基因, 只有 4 种(表 1)。

2.7 蛋白信号肽及跨膜结构域的预测

分析表明, SignalP v3.0 程序预测该 cDNA 文库的 272 条序列中具有分泌蛋白信号肽的有 12 个, 占 4.4%, 隐马可夫模型 (HMM) 算法预测的具有分泌蛋白信号肽的序列为 27 个, 占 9.9%。比较 2 种算法的分析结果, 前者分析具有信号肽, 而后者分析不具有信号肽的蛋白有 7 个, 反之则有 22 个。因此, 同时满足上述 2 种算法具有分泌信号肽的蛋白有 5 个。从 TMHMM v2.0 程序蛋白跨膜结构域分析结果可以看出, 5 个蛋白中只有 1 个含有 2 个跨膜域, 另外 4 个信号肽则不含跨膜结构域; 由于 TMHMM 程序可能无法将信号肽序列和跨膜结构域区分开, 因此, 所预测的 4 个不含跨膜域的蛋白和 1 个含有跨膜域的蛋白都可

初步推断为分泌蛋白。这 5 个蛋白中有 1 个为未知蛋白, 另外 4 个 EST 的同源基因名称分别为鼠李糖结合凝集素(rhamnose binding lectin); 组蛋白 H2A (histone H2A); β -血红蛋白 A 链(hemoglobin beta-A chain); 热休克蛋白 70(heat shock protein 70)。

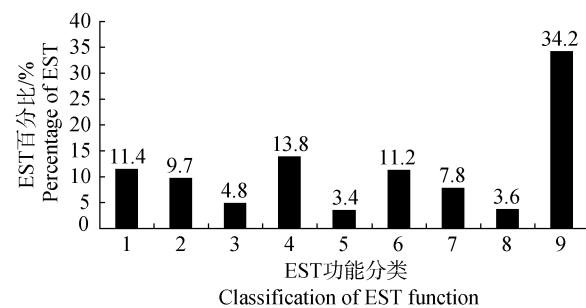


图 7 消减文库中 587 个有效 ESTs 的功能分布
1、核糖体蛋白; 2、细胞免疫防御蛋白; 3、细胞骨架相关蛋白; 4、细胞代谢/呼吸相关蛋白; 5、细胞信号转导/粘附相关蛋白; 6、细胞周期/DNA 复制/蛋白调控/转录/翻译相关蛋白; 7、转运相关蛋白; 8、未知功能蛋白; 9、与数据库无显著同源性的 ESTs。

Fig. 7 Functional classification of 587 ESTs in subtractive library

1. Ribosomal proteins;
2. Cell immunity/defense/stress proteins;
3. Cytoskeleton proteins;
4. Cell metabolism/ respiratory chain proteins;
5. Cell signaling/adhering proteins;
6. Cell cycle/DNA replication/protein regulation/ transcription/translation proteins;
7. Transfer proteins;
8. Unknown function proteins;
9. No significant similarity found.

3 讨论

与哺乳动物相比, 鱼类免疫系统的分子研究还处于起步阶段^[9], 鉴定的鱼类免疫相关基因还很有限。其中原因是复杂的, 从使用的技术来看, 借鉴已有的哺乳类免疫基因信息, 仅用已有的 PCR 和杂交方法来鉴定鱼类同源基因比较困难^[14]。鱼类具有复杂的生物多样性导致鱼类免疫机制的多样性和复杂性, 而鱼类又处于低等的脊椎动物进化地位, 因此鱼类免疫相关基因与哺乳类相比不仅同源性偏低而且可能还有较大变异。采用 EST 测序大量分析免疫细胞的基因转录信息, 理论上可以获得重要的鱼类免疫相关基因, 但是工作量大且效果不明显^[9]。例如有学者对鱼类肝、脾和

表 1 哈氏弧菌灭活疫苗诱导的红笛鲷头肾消减文库中分离的 ESTs

Tab. 1 ESTs isolated from the head kidney subtractive library of red snapper induced by inactivated *Vibrio harveyi* vaccine

| 推测的同源基因 putative homologous gene | 同源种名称 homolog species | 长度/bp length | 同源性 identity | 期望值 E-value | 克隆数 nos. of clones |
|--|---------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------|
| 核糖体蛋白相关基因 ribosomal protein | | | | | |
| ribosomal protein S6 | <i>Esox lucius</i> | 164 | 47/51 (92%) | 2.00E-20 | 4 |
| ribosomal protein S7 | <i>Takifugu rubripes</i> | 237 | 78/79 (98%) | 1.00E-35 | 1 |
| ribosomal protein S8 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 186 | 59/59 (100%) | 9.00E-77 | 1 |
| ribosomal protein S16 | <i>Rana catesbeiana</i> | 197 | 55/62 (89%) | 3.00E-22 | 4 |
| ribosomal protein S17 | <i>Siniperca chuatsi</i> | 245 | 81/81 (100%) | 4.00E-97 | 3 |
| ribosomal protein S18 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 235 | 75/76 (98%) | 2.00E-34 | 1 |
| ribosomal protein S24 | <i>Pagrus major</i> | 248 | 77/81 (95%) | 1.00E-52 | 6 |
| ribosomal protein SA | <i>Osmerus mordax</i> | 379 | 123/125 (98%) | 2.00E-93 | 2 |
| ribosomal protein L4 | <i>Pagrus major</i> | 249 | 82/82 (100%) | 2.00E-84 | 2 |
| ribosomal protein L5 | <i>Dicentrarchus labrax</i> | 192 | 60/64 (93%) | 2.00E-35 | 2 |
| ribosomal protein L6 | <i>Pagrus major</i> | 122 | 28/40 (70%) | 4.00E-06 | 2 |
| ribosomal protein L7 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 162 | 49/53 (92%) | 4.00E-19 | 4 |
| ribosomal protein L8 | <i>Lates calcarifer</i> | 161 | 53/53 (100%) | 7.00E-25 | 6 |
| ribosomal protein L10 | <i>Solea senegalensis</i> | 149 | 49/49 (100%) | 4.00E-22 | 3 |
| ribosomal protein L11 | <i>Gillichthys mirabilis</i> | 149 | 25/46 (54%) | 1.00E-07 | 1 |
| ribosomal protein L13 | <i>Solea senegalensis</i> | 211 | 63/65 (96%) | 4.00E-27 | 8 |
| ribosomal protein L14 | <i>Oreochromis niloticus</i> | 201 | 51/63 (81%) | 1.00E-18 | 3 |
| ribosomal protein L15 | <i>Siniperca kneri</i> | 259 | 78/82 (95%) | 3.00E-31 | 2 |
| ribosomal protein L17 | <i>Solea senegalensis</i> | 149 | 32/42 (76%) | 4.00E-09 | 1 |
| ribosomal protein L19 | <i>Solea senegalensis</i> | 263 | 45/77 (58%) | 2.00E-09 | 1 |
| ribosomal protein L21 | <i>Solea senegalensis</i> | 201 | 31/56 (55%) | 2.00E-05 | 5 |
| ribosomal protein L27 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 316 | 97/98 (98%) | 4.00E-50 | 1 |
| ribosomal protein L32 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 215 | 66/67 (98%) | 5.00E-25 | 2 |
| ribosomal protein L35 | <i>Esox lucius</i> | 229 | 75/76 (98%) | 3.00E-19 | 2 |
| 细胞免疫防御相关基因 cell immunity/defense/stress | | | | | |
| heat shock protein 10 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 252 | 69/80 (86%) | 5.00E-40 | 1 |
| heat shock protein 70 | <i>Megalobrama amblycephala</i> | 198 | 64/65 (98%) | 2.00E-05 | 2 |
| heat shock protein 90 | <i>Dicentrarchus labrax</i> | 354 | 109/111 (98%) | 9.00E-66 | 1 |
| immunoglobulin mu heavy chain | <i>Epinephelus coioides</i> | 149 | 21/49 (42%) | 2.00E-06 | 5 |
| immunoglobulin light chain precursor | <i>Seriola quinqueradiata</i> | 192 | 57/63 (90%) | 9.00E-17 | 2 |
| immunoglobulin light chain isotype L3 | <i>Trematomus bernacchii</i> | 112 | 35/37 (94%) | 4.00E-06 | 1 |
| immunoglobulin heavy chain variable region | <i>Anarhichas minor</i> | 147 | 39/44 (89%) | 2.00E-11 | 1 |
| LBP/BPI | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 227 | 46/65 (70%) | 1.00E-21 | 3 |
| MHC class I antigen | <i>Lutjanus campechanus</i> | 194 | 44/57 (77%) | 1.00E-10 | 2 |
| MHC class II antigen | <i>Salmo salar</i> | 708 | 190/223 (85%) | 2.00E-78 | 1 |
| myeloid differentiation factor 88 | <i>Paralichthys olivaceus</i> | 210 | 51/69 (73%) | 5.00E-23 | 2 |
| rhamnose binding lectin | <i>Channa argus</i> | 166 | 33/54 (61%) | 1.00E-08 | 2 |
| rhamnose binding lectin STL2 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 219 | 34/52 (65%) | 5.00E-05 | 1 |
| toll-like receptor 1 protein | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 197 | 39/42 (92%) | 5.00E-16 | 2 |
| complement C1q subcomponent subunit C | <i>Salmo salar</i> | 432 | 57/79 (72%) | 2.00E-06 | 1 |
| nonspecific cytotoxic cell receptor protein-1 | <i>Sparus aurata</i> | 331 | 75/91 (82%) | 5.00E-29 | 2 |

续表 1

Tab.1 continued

| 推测的同源基因 putative homologous gene | 同源种名称 homolog species | 长度/bp length | 同源性 identity | 期望值 E-value | 克隆数 nos. of clones |
|--|--------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------|
| 细胞免疫防御相关基因 cell immunity/defense/stress | | | | | |
| nonspecific cytotoxic cell receptor protein-1 | <i>Sparus aurata</i> | 331 | 75/91 (82%) | 5.00E-29 | 2 |
| tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A | <i>Salmo salar</i> | 661 | 90/218 (41%) | 3.00E-25 | 3 |
| natural resistance-associated macrophage protein | <i>Pagrus major</i> | 166 | 31/32 (96%) | 2.00E-11 | 1 |
| deleted in malignant brain tumors 1 | <i>Monodelphis domestica</i> | 169 | 36/54 (66%) | 9.00E-15 | 2 |
| similar to putative CD163 antigen | <i>Gallus gallus</i> | 187 | 36/55 (65%) | 5.00E-09 | 2 |
| colony stimulating factor 3 receptor | <i>Salmo salar</i> | 334 | 69/111 (62%) | 4.00E-25 | 2 |
| annexin 11a isoform 2 | <i>Danio rerio</i> | 147 | 46/48 (95%) | 5.00E-18 | 2 |
| granulocyte stimulating factor receptor | <i>Salmo salar</i> | 304 | 69/101 (68%) | 7.00E-27 | 1 |
| TNFAIP3 interacting protein 1 | <i>Danio rerio</i> | 154 | 38/41 (92%) | 3.00E-31 | 4 |
| Integrin beta-1 precursor | <i>Salmo salar</i> | 248 | 51/65 (78%) | 2.00E-19 | 1 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 | <i>Salmo salar</i> | 151 | 38/40 (95%) | 6.00E-16 | 3 |
| novel NACHT domain containing protein | <i>Danio rerio</i> | 183 | 28/50 (56%) | 1.00E-07 | 1 |
| beta-2-microglobulin | <i>Barbus intermedius</i> | 204 | 47/67 (70%) | 5.00E-12 | 1 |
| Coronin-1A | <i>Salmo salar</i> | 162 | 39/52 (75%) | 1.00E-24 | 3 |
| tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2 | <i>Salmo salar</i> | 363 | 42/100 (42%) | 7.00E-12 | 1 |
| 细胞骨架相关基因 cytoskeleton | | | | | |
| beta actin | <i>Epinephelus coioides</i> | 439 | 145/146 (99%) | 4.00E-78 | 18 |
| Alpha actin | <i>Monopterus albus</i> | 217 | 64/72 (88%) | 4.00E-32 | 2 |
| filamin A, alpha (actin binding protein 280) | <i>Danio rerio</i> | 350 | 81/89 (91%) | 5.00E-18 | 3 |
| Tubulin alpha-1A chain | <i>Salmo salar</i> | 322 | 106/107 (99%) | 2.00E-33 | 5 |
| 细胞代谢/呼吸链相关基因 cell metabolism/respiratory chain | | | | | |
| cytochrome c oxidase subunit Va precursor | <i>Scombridae gen. sp.</i> | 224 | 68/73 (93%) | 6.00E-24 | 10 |
| hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase | <i>Danio rerio</i> | 323 | 97/105 (92%) | 2.00E-41 | 1 |
| CDC-like kinase 4 | <i>Salmo salar</i> | 157 | 32/35 (91%) | 4.00E-11 | 2 |
| creatine kinase | <i>Tylosurus crocodilus</i> | 149 | 29/41 (71%) | 3.00E-08 | 2 |
| Low choriolytic enzyme precursor | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 276 | 73/91 (80%) | 1.00E-34 | 1 |
| Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein | <i>Osmerus mordax</i> | 253 | 59/74 (80%) | 1.00E-11 | 1 |
| Eukaryotic initiation factor 4A-III | <i>Esox lucius</i> | 369 | 41/52 (79%) | 6.00E-05 | 1 |
| Gamma-glutamyl hydrolase precursor | <i>Salmo salar</i> | 300 | 79/99 (79%) | 3.00E-37 | 3 |
| ATP synthase subunit alpha, mitochondrial | <i>Salmo salar</i> | 239 | 43/46 (93%) | 7.00E-09 | 1 |
| Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial precursor | <i>Salmo salar</i> | 291 | 74/78 (94%) | 2.00E-27 | 1 |
| glutamine synthetase | <i>Bostrychus sinensis</i> | 222 | 61/73 (84%) | 2.00E-28 | 2 |
| Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E-interacting protein | <i>Salmo salar</i> | 198 | 61/65 (94%) | 2.00E-22 | 1 |
| Adenosylhomocysteinase B | <i>Salmo salar</i> | 172 | 36/38 (94%) | 9.00E-13 | 1 |
| glutathione S-transferase | <i>Oplegnathus fasciatus</i> | 213 | 66/70 (94%) | 4.00E-31 | 3 |
| glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 | <i>Danio rerio</i> | 332 | 80/96 (83%) | 8.00E-42 | 1 |
| myo-inositol monophosphatase | <i>Oreochromis mossambicus</i> | 366 | 91/100 (91%) | 2.00E-20 | 3 |
| transketolase-like 2 | <i>Danio rerio</i> | 180 | 38/54 (70%) | 1.00E-27 | 2 |

续表 1

Tab.1 continued

| 推测的同源基因 putative homologous gene | 同源种名称 homolog species | 长度/bp length | 同源性 identity | 期望值 E-value | 克隆数 nos. of clones |
|---|-----------------------------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------|
| 细胞代谢/呼吸链相关基因 cell metabolism/respiratory chain | | | | | |
| malate dehydrogenase | <i>Sphyraena idiastes</i> | 278 | 87/92 (94%) | 5.00E-28 | 2 |
| glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | <i>Salmo salar</i> | 151 | 36/46 (78%) | 6.00E-15 | 5 |
| arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic | <i>Salmo salar</i> | 207 | 62/68 (91%) | 4.00E-26 | 3 |
| glutamate dehydrogenase | <i>Salmo salar</i> | 387 | 95/108 (88%) | 5.00E-34 | 3 |
| nucleoside diphosphate kinase | <i>Sparus aurata</i> | 169 | 49/51 (96%) | 5.00E-18 | 16 |
| lysyl-tRNA synthetase | <i>synthetic construct</i> | 111 | 32/36 (88%) | 9.00E-12 | 8 |
| eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 | <i>Osmerus mordax</i> | 277 | 39/44 (88%) | 4.00E-13 | 3 |
| leukotriene A-4 hydrolase | <i>Salmo salar</i> | 252 | 73/83 (87%) | 6.00E-36 | 3 |
| Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 | <i>Oryctolagus cuniculus</i> | 198 | 53/55 (96%) | 1.00E-17 | 2 |
| 细胞信号/黏附相关基因 cell signaling/adhering | | | | | |
| Moesin | <i>Danio rerio</i> | 158 | 39/42 (93%) | 9.00E-15 | 1 |
| plexin C1 | <i>Danio rerio</i> | 273 | 29/69 (42%) | 2.00E-08 | 1 |
| phospholipase C, gamma 2 | <i>Danio rerio</i> | 276 | 57/67 (85%) | 4.00E-25 | 1 |
| phosphatase and tensin-like protein A long splice variant | <i>Danio rerio</i> | 125 | 33/41 (80%) | 9.00E-07 | 1 |
| ankyrin repeat and SOCS box-containing 5 | <i>Danio rerio</i> | 295 | 53/82 (64%) | 5.00E-26 | 1 |
| granulocyte stimulating factor receptor | <i>Salmo salar</i> | 334 | 69/111 (62%) | 7.00E-25 | 1 |
| F-box/WD repeat-containing protein 11 | <i>Salmo salar</i> | 538 | 131/131 (100%) | 2.00E-70 | 3 |
| LEM domain containing 3 | <i>Danio rerio</i> | 288 | 54/93 (58%) | 6.00E-16 | 2 |
| Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha | <i>Danio rerio</i> | 157 | 37/51 (72%) | 9.00E-11 | 1 |
| similar to FMS-like tyrosine kinase 3 | <i>Danio rerio</i> | 339 | 69/96 (71%) | 1.00E-43 | 1 |
| guanine nucleotide binding protein (G protein) | <i>Bos taurus</i> | 151 | 50/50 (100%) | 2.00E-47 | 3 |
| Kelch-like protein 6 | <i>Salmo salar</i> | 161 | 33/53 (62%) | 2.00E-10 | 4 |
| 细胞周期/DNA 复制/蛋白调控/转录/翻译相关基因 | | | | | |
| cell cycle/DNA replication/protein regulation/transcription/translation | | | | | |
| novel protein similar to HLA-B-associated transcript 3 | <i>Danio rerio</i> | 525 | 120/174 (68%) | 3.00E-30 | 1 |
| 4SNc-Tudor domain protein | <i>Takifugu rubripes</i> | 244 | 55/61 (90%) | 4.00E-16 | 1 |
| ribonucleotide reductase M2 | <i>Sus scrofa</i> | 153 | 50/50 (100%) | 1.00E-15 | 1 |
| DNA ligase 1 | <i>Danio rerio</i> | 217 | 37/52 (71%) | 4.00E-08 | 3 |
| mitosis-specific chromosome segregation protein SMC1 homolog | <i>Takifugu rubripes</i> | 255 | 45/57 (78%) | 9.00E-12 | 2 |
| ornithine decarboxylase antizyme large isoform | <i>Paralichthys olivaceus</i> | 194 | 48/58 (83%) | 7.00E-15 | 2 |
| splicing factor 3b, subunit 1 isoform 1 | <i>synthetic construct</i> | 227 | 35/55 (64%) | 4.00E-09 | 2 |
| TCP1-beta | <i>Notothenia coriiceps</i> | 202 | 54/59 (91%) | 9.00E-23 | 6 |
| chromobox protein homolog 3 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 440 | 126/146 (86%) | 1.00E-35 | 1 |
| nucleolar protein 5A | <i>Salmo salar</i> | 222 | 67/73 (91%) | 7.00E-23 | 3 |
| myeloid leukemia differentiation protein homologue | <i>Salmo salar</i> | 379 | 56/73 (76%) | 2.00E-26 | 1 |
| annexin max3 | <i>Oryzias latipes</i> | 216 | 61/71 (85%) | 3.00E-26 | 5 |
| elongation factor-1 alpha | <i>Glossurocolletes bilobatus</i> | 154 | 23/25 (92%) | 8.00E-05 | 3 |
| histone H2A | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 227 | 53/53 (100%) | 4.00E-66 | 3 |
| similar to H2A histone family, member V isoform 1 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 211 | 53/53 (100%) | 4.00E-66 | 2 |

续表 1

Tab.1 continued

| 推测的同源基因 putative homologous gene | 同源种名称 homolog species | 长度/bp length | 同源性 identity | 期望值 E-value | 克隆数 nos.of clones |
|---|-----------------------------|--------------|-----------------|----------------|----------------------|
| 细胞周期/DNA 复制/蛋白调控/转录/翻译相关基因 | | | | | |
| cell cycle/DNA replication/protein regulation/transcription/translation | | | | | |
| Histone H3.3 | <i>Oncorhynchus mykiss</i> | 355 | 91/91 (100%) | 1.00E-42 | 3 |
| Elongation factor 2 | <i>Salmo salar</i> | 277 | 76/92 (82%) | 1.00E-35 | 3 |
| poly A binding protein, cytoplasmic 1 a | <i>Aristichthys nobilis</i> | 180 | 33/34 (97%) | 4.00E-19 | 3 |
| T-complex protein 1 subunit beta | <i>Salmo salar</i> | 208 | 37/39 (94%) | 3.00E-06 | 1 |
| YIPF3 protein | <i>Salmo salar</i> | 182 | 31/40 (77%) | 3.00E-07 | 2 |
| MCM7 minichromosome maintenance deficient 7 | <i>Danio rerio</i> | 135 | 38/44 (86%) | 3.00E-13 | 4 |
| lysine (K)-specific demethylase 5Ba | <i>Danio rerio</i> | 387 | 80/125 (64%) | 4.00E-29 | 1 |
| small nuclear ribonucleoprotein G | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 285 | 23/23 (100%) | 4.00E-08 | 3 |
| lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase | <i>Salmo salar</i> | 267 | 58/67 (87%) | 2.00E-14 | 1 |
| Cystatin-B | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 188 | 43/61 (70%) | 5.00E-12 | 2 |
| QM-like protein | <i>Sciaenops ocellatus</i> | 169 | 49/49 (100%) | 9.00E-20 | 2 |
| basic leucine zipper and W2 domains 1b | <i>Danio rerio</i> | 273 | 49/52 (94%) | 1.00E-19 | 1 |
| nucleoporin 205 | <i>Danio rerio</i> | 168 | 47/54 (87%) | 7.00E-10 | 3 |
| probable ribosome biogenesis protein RLP24 | <i>Esox lucius</i> | 176 | 55/58 (94%) | 1.00E-21 | 1 |
| 转运蛋白相关基因 transfer proteins | | | | | |
| tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6 | <i>Salmo salar</i> | 189 | 54/62 (87%) | 4.00E-22 | 3 |
| hemoglobin beta-A chain | <i>Siniperca chuatsi</i> | 183 | 31/40 (78%) | 5.00E-09 | 6 |
| glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 | <i>Danio rerio</i> | 225 | 63/74 (85%) | 1.00E-22 | 1 |
| alpha-hemoglobin A | <i>Siniperca chuatsi</i> | 260 | 70/86 (81%) | 3.00E-17 | 7 |
| vacuolar proton pump subunit D | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 321 | 104/107 (97%) | 1.00E-49 | 1 |
| mitochondrial ornithine transporter 1 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 474 | 125/157 (79%) | 2.00E-54 | 5 |
| similar to ADP/ATP translocase | <i>Equus caballus</i> | 259 | 44/44 (100%) | 1.00E-18 | 1 |
| cytochrome b ascorbate-dependent protein 3 | <i>Esox lucius</i> | 169 | 42/56 (75%) | 4.00E-11 | 6 |
| dynein light chain 2 | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 417 | 136/138 (99%) | 6.00E-84 | 5 |
| ATP synthase lipid-binding protein, mitochondrial precursor | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 243 | 34/34 (100%) | 3.00E-10 | 1 |
| cytochrome c oxidase polypeptide VIc precursor | <i>Anoplopoma fimbria</i> | 157 | 30/32 (93%) | 1.00E-07 | 5 |
| phosphate carrier protein, mitochondrial precursor | <i>Osmerus mordax</i> | 303 | 89/98 (90%) | 3.00E-30 | 1 |
| choline transporter-like protein 2 | <i>Salmo salar</i> | 286 | 27/28 (96%) | 2.00E-08 | 1 |

皮肤等免疫因子合成旺盛的器官进行了 EST 分析^[15-16], 虽然得到了许多推导的与免疫和生物防御相关的基因, 其中还有很多找不到与哺乳类同源的新基因。SSH 技术自报道以来, 因其具有特异高效、简便易行等突出优点, 与其他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。该技术能指数富集稀

有表达基因, 可以有效解决 EST 序列分析遇到的问题, 而且已经多次应用于免疫器官和细胞的差异表达基因的鉴定和克隆^[17-22], 并分离了多种差异表达基因。

近年来, 生物信息学提供了相当数量且可信度较高的网络软件, 供用户对序列进行相应的分析。迄今为止, SignalP 程序已被成功地用于蛋白

质信号肽序列的分析和预测。Lee 等^[23]用 SignalP v2.0 分析了假丝酵母 (*Candida albicans*) 中 47 个已知分泌蛋白和 47 个已知的非分泌蛋白, 预测结果与试验结论一致; Torto 等^[24]用 Signal P v2.0 分析了马铃薯晚疫病菌的 2147 个表达标签序列, 结果 261 个 EST 预测为分泌蛋白编码基因。这些结果充分证明, 本研究采用的信号肽预测程序可靠。但是由于这些预测程序是根据大多数目标蛋白的序列特征来进行预测, 因此其精确度无法达到 100%, 存在判断偏差的可能性, 会出现一些已经被证明具有信号肽及跨膜结构域序列的蛋白, 由于其结构上不具有相应的特征, 从而被预测软件剔除掉的现象^[25]。因而, 在进行信号肽的分析时应该采用多种策略、利用多个软件对目标序列进行筛选以保证预测结果的准确性。另外, 由于本实验室采用 SSH 技术构建的红笛鲷头肾消减 cDNA 文库中均为 EST 序列, 平均长度仅为 272 bp, 只包含基因全长信息的一小部分, 因而有些基于全长预测的软件无法对其进行准确预测。所以, 单靠软件来预测未知基因的功能、特征是不完全可靠的, 还要结合实验加以佐证。

本实验采取人工免疫的模式, 探讨红笛鲷头肾组织在异物侵入的条件下不同免疫相关因子的表达分布。从笔者获得的差异表达 EST 功能的组成上看, 参与免疫相关基因的表达明显得到充分的激活, 所获得免疫相关的 EST 有 30 种, 其中许多免疫相关基因在生物体的免疫防御进程中发挥重要作用。如热休克蛋白家族基因, 它们是一类广泛存在于细胞内、进化上高度保守的可溶性蛋白, 在生物体内发挥重要的作用, 包括辅助新生肽的折叠、细胞器间蛋白质的转运、蛋白复合体的装配和解离、变性蛋白的重折叠或降解以及病理蛋白凝集体的溶解等^[13]; MHC 家族基因, 它们的主要免疫功能是识别、清除外来和内在抗原, 在免疫反应中起着十分重要的作用, 且许多与免疫有关的重要基因都在 MHC 位点上, 其编码产物与抗原肽结合, 并将其呈现在细胞表面传递给 T 细胞作为识别标志, 当有外来抗原被

识别时, 免疫系统开始启动免疫反应; 补体是机体抵抗微生物感染的重要成分, 由存在于体液中的数十种具有酶活性的球蛋白组成, 其主要作用是促进吞噬作用而不是细胞溶解; 免疫球蛋白是初级免疫应答中最持久、最重要的抗体, 大多是抗菌性、抗毒性和抗病毒抗体, 它在抗感染中起到主力军作用, 它能够促进单核巨噬细胞的吞噬作用, 中和细菌毒素的毒性和病毒抗原结合使病毒失去感染宿主细胞的能力^[26]。

采用抑制性消减杂交(SSH)技术构建哈氏弧菌灭活疫苗体内诱导红笛鲷消减文库, 并对文库中获得的 EST 序列进行大规模生物信息学分析的研究在国内外尚属首次。本研究通过对筛选的 680 个克隆进行测序分析后, 共获得了 587 条有效 EST 序列, 其中 386 条 EST 序列与 NCBI 数据库中已知功能蛋白具较高同源性, 21 条 EST 序列为未知功能蛋白, 201 条 EST 序列在数据库中未发现同源序列。而迄今为止, GenBank 数据库中红笛鲷相关的 EST 序列只有不到 10 条(2010 年 3 月 14 日数据: 6 条)。因此, 本研究中获得的实验数据极大地丰富了红笛鲷 EST 数据资源, 为红笛鲷基因组学和功能基因的研究提供极大便利。实验获得的绝大多数类型的基因都是在红笛鲷中尚未见报道, 本研究的主要意义首先在于它为红笛鲷防病、抗病以及遗传育种工作提供了重要的理论基础; 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, 以监测鱼生长环境中物理化学条件的变化, 更好地指导养殖生产^[27]; 同时凝集素基因^[28]、巨球蛋白基因^[29]等可以用作选育优良抗病品系的标记。

参考文献:

- [1] Diatchenko L, 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]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93 (12): 6025–6030.
- [2] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput

- screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(13): 2598–2602.
- [3] Bayne C J, Gerwick L, Fujiki K, et al. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25(3): 205–217.
- [4] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2003, 27(2): 113–118.
- [5] 程起群. 抑制消减杂交 (SSH) 及其在鱼类基因克隆中的应用 [J]. 水产学报, 2004, 28(3): 323–328.
- [6] Deane E E, Woo N Y. Impact of heavy metals and organochlorines on HSP70 and HSC70 gene expression in black sea bream fibroblasts [J]. Aquat Toxicol, 2006, 79(1): 9–15.
- [7] Du S J, Li H Q, Bian Y H, et al. Heat-shock protein 90 α 1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(2): 554–559.
- [8] 苏建明. 草鱼肠道组织消减 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的克隆与表达分析 [D]. 长沙: 湖南大学, 2007: 51–58.
- [9] 贾伟章. 乌鳢免疫相关基因的克隆鉴定与特征分析 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2007: 1–20.
- [10] Gao Q, Zhao J M, Song L S, et al. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 24(4): 379–385.
- [11] Sreedhar A S, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: A comprehensive review [J]. Pharmacol Ther, 2004, 101(3): 227–257.
- [12] Liu X, Ye L, Wang J, et al. Expression of heat shock protein 90 β in human gastric cancer tissue and SGC7901/ VCR of MDR-type gastric cancer cell line [J]. Chin Med J, 1999, 112(12): 1133–1137.
- [13] 王忠良. 马氏珠母贝免疫相关基因的克隆与表达 [D]. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2009: 22.
- [14] Liu M, Reimschuessel R, Hassel B A. Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15kDa (ISG15) orthologue: a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage [J]. Gene, 2002, 298 (2): 129–139.
- [15] Inoue S, Nam B H, Hirono I, et al. A survey of expressed genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) liver and spleen [J]. Mol Biol Biotechnol, 1997, 6 (4): 376–380.
- [16] Altmann S M, Mellon M T, Distel D L, et al. Molecular and functional analysis of an interferon gene from the zebrafish, *Danio rerio* [J]. J Virol, 2003, 77 (3): 1992–2002.
- [17] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization [J]. Immunogenetics, 1999, 49 (10): 909–914.
- [18] Fujiki K, Shin D, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor γ -subunit and serum amyloid A [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (3): 229–242.
- [19] Mollenhauer M A M, Carter B J, Peden-Adamsa M M, et al. Gene expression changes in bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, skin cells following exposure to methylmercury (MeHg) or perfluorooctane sulfonate (PFOS) [J]. Aquat Toxicol, 2009, 91 (1): 10–18.
- [20] Ewarta K V, Belanger J C, Williams J, et al. Identification of genes differentially expressed in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in response to infection by *Aeromonas salmonicida* using cDNA microarray technology [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29 (4): 333–347.
- [21] Bayne C J, Gerwick L, Fujiki K, et al. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization [J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25 (3): 205–217.
- [22] Wang L, Wu X. Identification of differentially expressed genes in lipopolysaccharide-stimulated yellow grouper *Epinephelus awoara* spleen [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 23 (2): 354–363.
- [23] Lee S A, Wormsley S, Kamoun S, et al. An analysis of the *Candida albicans* genome database for soluble secreted proteins using computer based prediction algorithms [J]. Yeast, 2003, 20: 595–610.
- [24] Torto T A, Li S, Styer A, et al. EST mining and functional expression assays identify extra-cellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora* [J]. Genome Res, 2003, 13: 1675–1685.
- [25] 薛晓丹, 屈志鹏, 王晓杰, 等. 小麦条锈菌萌发夏孢子 cDNA 文库中编码分泌蛋白的序列预测 [J]. 西北农林科

- 技大学学报, 2009, 37(2): 105–111.
- [26] 李楠. 斜带石斑鱼 MHC 基因克隆、表达及多态性分析 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2009: 7–16.
- [27] Milani V, Noessner E, Ghose S, et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation [J]. Int J Hyperther, 2002, 18 (6): 563–575.
- [28] 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]. Dev Comp Immunol, 2006, 30 (7): 607–617.
- [29] Leuven F. Human α 2-macroglobulin [J]. Mol Cell Biochem, 1984, 58: 121–128.

Construction and analysis of subtractive cDNA library of head kidney in humphead snapper, *Lutjanus sanguineus*

ZHANG Xinzong^{1, 2, 3, 4}, WU Zaohe^{3, 4}, JIAN Jichang^{3, 4}, LU Yishan^{3, 4}

1. South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology and Epidemiology for Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China;

4. Guangdong Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China

Abstract: A subtracted cDNA library of humphead snapper (*Lutjanus sanguineus*) was constructed by suppression subtractive hybridization technology (SSH) to screen immune-related EST. The cDNA library has been constructed by the mRNA of the test group and driven by SSH. Differential ESTs from the subtracted cDNA library have been identified by both PCR technology and dot blot hybridization. Six hundred and eighty positive clones were sequenced by Sangon Biological Engineering Technology & Services Co., Ltd. The homology of the sequences was analyzed by BLASTx tool and BLASTn tool in GenBank database. Functional distribution was performed based on the features of ESTs by gene ontology annotation (GO) and 30 immune-related ESTs of *L. sanguineus*, such as major histocompatibility complex gene (*MHC I* and *MHC II*), immunoglobulin gene (*IgH* and *IgL*), heat shock protein gene (*HSP10*, *HSP70* and *HSP90*) and so on, were found. In this study, the subtracted cDNA library was successfully constructed by SSH and a number of immune-related ESTs of *L. sanguineus* were identified, which laid a foundation for the immune-related genes research of *L. sanguineus*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(2): 379–391]

Key words: *Lutjanus sanguineus*; suppression subtractive hybridization; cDNA library; immunologic gene

Corresponding author: WU Zaohe. E-mail: wuzh@gdou.edu.cn