

## 皱纹盘鲍外套膜耐维生素 E 缺乏消减 cDNA 文库的构建

刘晶, 张文兵, 麦康森, 付京花, 冯秀妮, 马洪明, 徐玮, 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:**为了克隆维生素 E 缺乏时皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)外套膜差异性表达的基因,本研究配制了维生素 E 缺乏水平(3.5 mg/kg)和正常添加水平(52.8 mg/kg)的人工饲料,喂养皱纹盘鲍幼鲍,初始体质量为(0.71±0.00) g,初始壳长为(15.49±0.04) mm,240 d 后,采用抑制消减杂交法(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)构建了维生素 E 缺乏组与正常组外套膜组织差异表达的 cDNA 消减文库。经检验,差异表达的基因均被富集了  $2^5 \sim 2^8$  倍,证明构建的 cDNA 消减文库具有很强的消减效率。从文库中随机挑取 100 个白色克隆摇菌液进行 PCR 鉴定,95%的克隆中均有 100~900 bp 的插入片段,这些片段可能是维生素 E 缺乏差异表达基因的 cDNA 片段。选取含插入片段大小不同的 48 个克隆测序,其中有 16 个新基因,10 个谷胱甘肽转移酶的基因,5 个谷胱甘肽过氧化物酶基因,2 个过氧化氢酶基因,3 个羟基类固醇脱氢酶基因,4 个酪氨酸激酶基因,1 个类甲状腺过氧化物酶蛋白基因,3 个纤维素酶基因,1 个 cAMP 效应元件结合蛋白基因,3 个贝壳生物矿化相关蛋白的基因。总的来说,利用抑制消减杂交的方法构建差异表达 cDNA 文库,可以比较好地反映维生素 E 对皱纹盘鲍影响的基因信息,为研究其他营养素对皱纹盘鲍基因表达的影响提供了基础数据。[中国水产科学,2007,14(3):383-389]

**关键词:**皱纹盘鲍;外套膜;维生素 E;抑制消减杂交;cDNA 消减文库

中图分类号:Q959.215

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2007)03-0383-07

维生素 E 为动物必需的一种营养素,在生物膜中是最有效的链中止脂溶性抗氧化剂,能够保护细胞免受活性氧(ROS)和脂质过氧化活性产物的损伤,维持细胞膜的完整性<sup>[1-3]</sup>。V<sub>E</sub> 缺乏可导致皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)生长减缓,死亡率升高;能够显著提高体内谷胱甘肽 S 转移酶(GST)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的活性以及矿物质元素 Ca、Mg 的含量;还可显著降低贝壳中文石晶体/方解石晶体的比例<sup>[4]</sup>。由此可见,维生素 E 对皱纹盘鲍的影响涉及到其生长、代谢、免疫和贝壳生物矿化等各方面。这些影响均与基因表达有关。通过有效分析 2 个 mRNA 群体间差异表达的基因,可以确定维生素 E 缺乏所造成影响与基因的关系。

抑制性消减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)是一种新的 cDNA 消减杂交方法,可用于分离 2 个 mRNA 群体间差异表达的基因,克服了 mRNA 差别显示技术(DDRT-PCR)的假阳性较高和代表性差示分析(RDA)的消减杂交

轮次较多的缺点<sup>[5-8]</sup>。经过抑制性消减杂交的 cDNA 群体不仅富集了差异表达基因(目的基因),而且目的基因间丰度的差异经过均衡化作用后已基本消除。经过抑制性消减杂交,2 个待比较的群体间差异表达的所有基因(高、中、低丰度)都能得到有效克隆。

本研究通过配制 3.5 mg/kg (V<sub>E</sub> 缺乏组)和 52.8 mg/kg (V<sub>E</sub> 正常组)2 个 V<sub>E</sub> 水平的饲料养殖皱纹盘鲍一定周期,利用抑制消减杂交技术,克隆皱纹盘鲍外套膜组织中差异表达的基因,为探讨维生素 E 缺乏影响机体代谢和贝壳生物矿化的分子机制提供基础数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物的饲养

**1.1.1 饲料的配制** 基础饲料参照 Mai 等<sup>[9]</sup>的配方,以酪蛋白和明胶为蛋白源,大豆油和鲱鱼油(1:1)为脂肪源,糊精为主要的糖源(表 1)。维生素 E (DL- $\alpha$ -生育酚)购自 Sigma 公司(St. Louis, MO,

收稿日期:2006-07-24;修订日期:2006-09-19。

基金项目:国家自然科学基金项目(30200215)。

作者简介:刘晶(1980-),女,硕士研究生,从事营养与基因表达方面的研究。E-mail: sanjingty@163.com

通讯作者:张文兵,副教授。Tel:0532-82032495。E-mail: wzhang@ouc.edu.cn

USA)。饲料维生素 E 的 2 个添加水平为:0 mg/kg (缺乏组),50 mg/kg(正常组)。采用高效液相色谱(HPLC)法<sup>[10]</sup>测定饲料中维生素 E 的含量分别为 3.5 mg/kg 和 52.8 mg/kg。

表 1 基础饲料的配方和成分组成

Tab. 1 Ingredient and proximate composition of basal diet

| 组成<br>Composition                | 含量/%<br>Content |
|----------------------------------|-----------------|
| 原料 Ingredient                    |                 |
| 酪蛋白(不含维生素) Casein                | 25.00           |
| 明胶 Gelatin                       | 6.00            |
| 糊精 Dextrin                       | 34.00           |
| 羧甲基纤维素 CM-cellulose              | 5.00            |
| 褐藻酸钠 Sodium alginate             | 20.00           |
| 维生素混合物 Vitamin mix <sup>1)</sup> | 2.00            |
| 无机盐混合物 Mineral mix <sup>2)</sup> | 4.00            |
| 豆油和鲱鱼油 SO/MFO <sup>3)</sup>      | 3.50            |
| 氯化胆碱 Choline chloride            | 0.50            |
| 化学成分 Proximate analysis          |                 |
| 粗蛋白 Crude protein                | 30.05           |
| 粗脂肪 Crude lipid                  | 3.29            |
| 灰分 Ash                           | 10.09           |

注:1) 每 1 000 g 饲料中含有盐酸硫胺 120.0 mg,核黄素 100.0 mg,叶酸 30.0 mg,尼克酸 800.0 mg,泛酸钙 200.0 mg,肌醇 4 000.0 mg,生物素 12.0 mg,维生素 B<sub>12</sub> 0.180 mg,维生素 B<sub>6</sub> 40.0 mg,维生素 A 500 000 IU,维生素 D 10 000 IU,维生素 C 4 000.0 mg,对氨基苯甲酸 400.0 mg。

2) 每 1 000 g 饲料中含有 NaCl 0.4 g,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6.0 g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10.0 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12.8 g,Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 8.0 g,柠檬酸铁 1.0 g,乳酸钙 1.4 g,ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 141.2 mg,MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 64.8 mg,CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12.4 mg,CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.4 mg,KIO<sub>3</sub> 1.2 mg,Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.4 mg。

3) 豆油与鲱鱼油体积比为 1 : 1。

Note:1) Vitamin mix: each 1 000 g of diet contained: Thiamin HCl 120.0 mg,Riboflavin 100.0 mg,Folic acid 30.0 mg,PABA 400.0 mg,Pyridoxine HCl 40.0 mg,Niacin 800.0 mg,Ca pantothenate 200.0 mg,Inositol 4 000.0 mg,Biotin 12.0 mg,Ascorbic acid 4 000.0 mg,Vitamin B<sub>12</sub> 180.0 μg,Vitamin A 500 000 IU,Vitamin D 10 000 IU。

2) Mineral mix: each 1000g of diet contained: NaCl 0.4 g,MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 6.0 g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10.0 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12.8 g;Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · H<sub>2</sub>O 8.0 g,Fe-citrate 1.0 g,Ca-lactate 1.4 g,ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 141.2 mg,MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 64.8 mg,CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 12.4 mg,CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.4 mg,KIO<sub>3</sub> 1.2 mg,Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> 0.4 mg。

3) Soybean oil;Menhaden fish oil=1 : 1。

**1.1.2 试验分组及管理** 试验用的皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)购于青岛大麦岛鲍鱼养殖场,其初始体质量为(0.71±0.00)g,初始壳长为(15.49±0.04)mm。正式实验开始前,用基础饲料驯化 14 天,然后随机分成 2 组,每组设 3 个重复,每

个重复放养 55 只。养殖实验在中国海洋大学室内循环水养殖系统中进行,共持续 240 d。每日下午 17 : 00 投喂饲料,次日 8 : 00 清除残饵。养殖过程中水温保持在 17.5~19.0 °C,盐度为 31~34,pH 值为 7.4~7.9,溶解氧不低于 7.0 mg/L。养殖周期为 240 d。

**1.1.3 样品的采集和处理** 养殖实验结束时,从每个重复组中随机抽取 20 只鲍个体,直接放到液氮中暂存,后转入-80 °C 冰箱保存。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 外套膜总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

将鲍鱼外套膜组织在液氮中研磨后,用 RNA 提取试剂盒(上海华舜公司)提取总 RNA,用 mRNA 纯化试剂盒(上海华舜公司)纯化提取 poly(A)<sup>+</sup> RNA。用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳对提取的 RNA 进行定性检测,并用紫外分光光度计检测总 RNA 和 poly(A)<sup>+</sup> RNA 样品的浓度和纯度。

**1.2.2 抑制性消减杂交** 采用 Clontech 公司提供的 PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 进行抑制性消减杂交,具体操作方法参照试剂盒的操作手册,以 V<sub>E</sub> 缺乏组的外套膜作为消减杂交的实验方(Tester),以正常组的外套膜作为驱动方(Driver)。其中 Driver cDNA 的制备是将正常组外套膜组织的 mRNA 逆转录合成双链 cDNA,然后用 Rsa I 充分酶切 3 h 后完成。Tester cDNA 的制备是将缺乏组外套膜组织合成的双链 cDNA 用 Rsa I 酶切后,分成 2 份,分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 连接后即制成 Tester1-1 cDNA 和 Tester1-2 cDNA。然后,以制备好的外套膜 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别进行抑制性消减杂交。

抑制性消减杂交过程:首先将 Tester1-1 cDNA 和 Tester1-2 cDNA 分别与 Driver cDNA 进行第 1 次杂交,混合 2 种杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA 进行第 2 次杂交,杂交产物随后以引物 primer 1(试剂盒提供)进行第 1 次 PCR 扩增,第 1 次 PCR 产物再用引物 Nested primer 1 和 2R(试剂盒提供)进行第 2 次 PCR 扩增,使特异于正常组外套膜组织的差异表达基因得到指数扩增。

**1.2.3 消减效率检测** 用皱纹盘鲍 β-actin 特异的上游引物:5' ATCTGGGTCATCTTTTCACGG 3',下游引物:5'GGCATCACACCTTCTACAACG 3',对消减后第 2 次 PCR 产物进行消减效率分析。

同时,以未经抑制性消减杂交的 cDNA(在制备 Tester cDNA 连接 2 种接头时,将刚加好样还未进行连接反应的 Tester1-1 cDNA 和 Tester1-2 cDNA 各取 2  $\mu$ L 混合,进行连接反应完成)作为对照进行 PCR,反应条件:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 94  $^{\circ}$ C,30 s;60  $^{\circ}$ C,30 s;72  $^{\circ}$ C,2 min,扩增 33 个循环,分别在第 18、23、28、33 循环处取 5  $\mu$ L 进行电泳,以检测消减效率。

**1.2.4 消减 cDNA 文库的构建** 将第 2 次 PCR 的产物连接到载体 pGEM-T easy(Promega 公司),转化到 JM109 感受态细胞,将菌液均匀涂布于含 Amp 的 LB/X-gal/IPTG 培养基上,在生化培养箱中于 37  $^{\circ}$ C 培养 16 h,构建皱纹盘鲍外套膜正向 cDNA 消减文库。挑取白色菌落接种于 1 mL LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 培养过夜。取 1  $\mu$ L 菌液,用巢氏引物进行 PCR 扩增,检测是否有插入片段,反应参数与第 2 次消减 PCR 相同,扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,有插入者加甘油保种于 -80  $^{\circ}$ C 中。

**1.2.5 克隆的序列测定及分析** 对阳性克隆结果进行测序(上海联合公司),应用生物信息学方法将测序结果与 GenBank 数据库进行同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 外套膜总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,提取的总 RNA 有 28S、18S 共 2 条带,且 28S 的亮度是 18S 亮度的 2 倍以上,说明总 RNA 质量很好;mRNA 表现为慧

尾片状条带。总 RNA、mRNA 的  $A_{260}/A_{280}$  值均为 1.9 左右,说明 RNA、mRNA 纯度较高(图 1)。

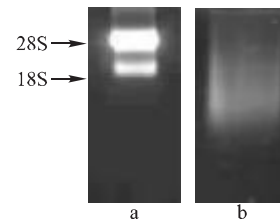


图 1 皱纹盘鲍外套膜组织总 RNA 和 mRNA 琼脂电泳图

a:总 RNA,b:mRNA

Fig. 1 Total RNA and mRNA isolated from the mantle of abalone *Haliotis discus hanai*

a:Total RNA,b:mRNA

### 2.2 双链 cDNA 的合成及酶切结果

经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,cDNA 表现为 >0.5 kb 的片状条带,酶切后 cDNA 表现为平均大小为 0.1~2 kb 的条带,说明 cDNA 酶切较完全。

### 2.3 消减杂交效率分析

用鲍鱼  $\beta$ -actin 特异性引物分别扩增未消减和消减后的第 2 次 PCR 产物。结果显示,相同 PCR 循环参数下,对于未经消减杂交的 cDNA,23 循环处即可见明显产物条带,而经过消减杂交的 cDNA,延迟 5~8 个循环后方可见 PCR 产物条带,差异表达的基因均被富集了  $2^5 \sim 2^8$  倍,说明消减杂交效率较高(图 2)。

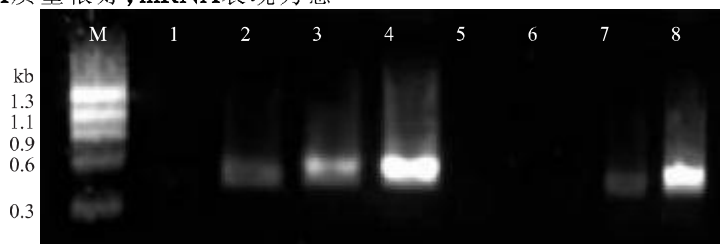


图 2 以鲍  $\beta$ -actin 基因为指标检测消减杂交效率

M: $\Phi$ X174-*Hae* III digest DNA marker;1-4:以未消减的 cDNA 为模板;5-8:以经消减后的 cDNA 为模板;1、5:18 个循环;2、6:23 个循环;3、7:28 个循环;4、8:33 个循环。

Fig. 2 PCR analysis of the subtractive hybridization efficiency by  $\beta$ -actin

PCR was performed on unsubtracted cDNA (lanes 1-4) and subtracted cDNA (lanes 5-8) 1 M: $\Phi$ X174-*Hae* III digest DNA marker;lanes 1 and 5:18th cycles;lanes 2 and 6:23th cycles;lanes 3 and 7:28th cycles;lanes 4 and 8:33th cycles.

## 2.4 两次抑制 PCR 对消减杂交产物的特异性扩增结果

用接头序列的外侧引物对消减杂交产物进行扩增,第30循环时可见较淡的片状 PCR 产物,位于

0.2~1.3 kb 之间。用接头序列的内侧引物对第一轮 PCR 稀释产物进行扩增,第15循环时可见 PCR 产物表现为 0.2~0.9 kb 之间的3条隐约可见的条带(图3)。

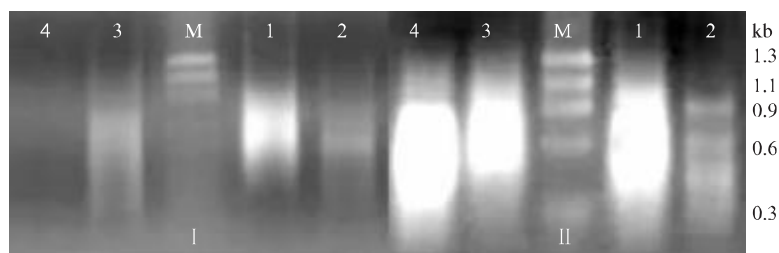


图3 抑制性消减杂交后 PCR 扩增的结果

I, 第一次 PCR 产物; II, 第二次 PCR 产物; M,  $\Phi$ X174-Hae III digest DNA marker; 1, 正向未消减 PCR 产物; 2, 正向消减 PCR 产物; 3, 反向未消减 PCR 产物; 4, 反向消减 PCR 产物。

Fig. 3 PCR products of subtractive hybridization

I, the first PCR product; II, the second PCR product; M,  $\Phi$ X174-Hae III digest DNA marker; Lane 1, unsorted products of forward subtraction; Lane 2, subtracted products of forward subtraction; Lane 3, unsorted products of reverse subtraction; Lane 4, subtracted products of reverse subtraction.

## 2.5 差异片段阳性克隆的筛选和测序

从 cDNA 消减文库随机挑取 100 个阳性克隆摇菌液,用巢氏引物进行 PCR 检测,检测显示 95 个克隆含有插入片段,长度主要分布在 100~900 bp,与 PCR 消减结果相符(图4)。

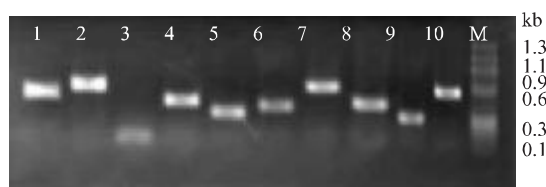


图4 消减文库部分克隆菌落 PCR 电泳图

M,  $\Phi$ X174-Hae III digest DNA marker; 1-10: 菌落中插入片段。

Fig. 4 Electrophoresis photograph of colony PCR results of some clones in subtracted library

M,  $\Phi$ X174-Hae III digest DNA marker; 1-10: products of colony PCR.

随机选取 48 个含有插入片段的阳性克隆送菌液测序,测序结果在 GenBank 数据库进行同源性比较。测序结果显示序列片段中最短的为 131 bp,最长的 775 bp,其中有 4 条序列带有 ploy(A)<sup>+</sup>(表2)。在这些基因之中,有 10 个谷胱甘肽转移酶(GST)基因,5 个谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)基因,2 个过氧化氢酶(CAT)基因,3 个羟基类固醇脱氢酶基因,4 个

酪氨酸激酶基因,1 个类甲状腺过氧化物酶蛋白基因,3 个纤维素酶基因,1 个 cAMP 效应元件结合蛋白基因以及 3 个贝壳生物矿化相关蛋白的基因。其他 16 个基因同 GenBank 中已知基因的 Score 值很低(<40),Evalue 值均大于 0.5,推测其可能为新基因。目前正在进行进一步的分析和功能鉴定。

## 3 讨论

抑制消减杂交(SSH)是一种寻找差异表达基因的十分有效的方法,它是抑制 PCR 为基础的消减杂交。所谓抑制 PCR,是利用非目标序列两端的反向重复序列在退火时产生“锅柄”结构,无法与引物配对,从而选择性地抑制非目标序列的扩增。用该方法克隆差异表达的基因,假阳性比率低,这是因为它的两步减法杂交和两步 PCR 特异扩增,保证了其具有较高的特异性。另外,SSH 技术最大的优势是对低丰度基因的富集作用,这是由 SSH 技术本身固有的均一化作用决定的。因此,低丰度的差异表达基因在应用 SSH 技术时也容易被克隆到。这是非常有意义的,因为往往低丰度的基因在生命活动中起着重要作用<sup>[5-8]</sup>。SSH 技术已被应用于越来越多的研究领域,在水产动物方面,已采用 SSH 技术从银鲫中克隆出肌酸激酶等一系列基因<sup>[11-13]</sup>,在鲤鱼(*Cyprinus carpio*)<sup>[14-20]</sup>、虹鳟(*Oncorhynchus*

mykiss)<sup>[21-23]</sup>中克隆出免疫调控相关基因。本研究首次将 SSH 技术应用到鲍鱼的营养与基因表达关系的研究中,结果表明该技术能够有效地克隆鲍鱼外套膜组织中差异表达的基因。以鲍鱼的  $\beta$ -actin 基因检测文库的消减效率显示,经过消减杂交,皱纹盘鲍外套膜组织差异表达的基因均被富集了  $2^5 \sim 2^8$  倍。

表 2 cDNA 消减文库部分序列分析和同源性比较结果  
Tab. 2 Sequence analysis and identities comparison of cDNA subtractive library

| 克隆编号<br>Clone number | 片段大小/bp<br>Insert size  | 同源性比较<br>Homolog comparison                                                 | 物种<br>Species                      | GenBank 登录号<br>GenBank accession No. |
|----------------------|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| E1/E20/E34/E35/E36   | 226/448/235<br>/770/770 | 谷胱甘肽 S 转移酶 1<br>Glutathione-S-transferase 1                                 | 鲍<br><i>H. discus discus</i>       | DQ530212                             |
| E18/E21/E23/E30      | 775/229<br>/192/192     | 谷胱甘肽 S 转移酶 2<br>Glutathione-S-transferase 2                                 | 鲍<br><i>H. discus discus</i>       | DQ530213                             |
| E16                  | 419                     | 谷胱甘肽 S 转移酶 3<br>Glutathione S-transferase 3                                 | 人<br><i>Homo sapiens</i>           | AL356441                             |
| E3/E11               | 196/381                 | 谷胱甘肽过氧化物酶 1<br>Glutathione peroxidase 1                                     | 斑马鱼<br><i>Danio rerio</i>          | NM_001007281                         |
| E13                  | 586                     | 谷胱甘肽过氧化物酶<br>Glutathione peroxidase                                         | 家蚕<br>domestic silkworm            | AB221014                             |
| E32/E39              | 682                     | 谷胱甘肽过氧化物酶 4b<br>Glutathione peroxidase 4b                                   | 斑马鱼<br><i>D. rerio</i>             | NM_001030070                         |
| E4/E22               | 208                     | 过氧化氢酶<br>Catalase                                                           | 鲍<br><i>Haliotis discus discus</i> | DQ530211                             |
| E19/E43/E25          | 381                     | 羟基类固醇脱氢酶 2<br>Hydroxysteroid dehydrogenase 2                                | 斑马鱼<br><i>D. rerio</i>             | NM_001040188                         |
| E6/E12/E41/E45       | 532                     | 酪氨酸激酶<br>Tyrosine kinase                                                    | 斑马鱼<br><i>D. rerio</i>             | CB363059                             |
| E9                   | 329                     | 类甲状腺过氧化物酶蛋白<br>Thyroid peroxidase-like protein                              | 绿海胆<br>Green sea urchin            | AY605095                             |
| E10/E44/E48          | 325                     | 纤维素酶基因<br>Hdcel-1 gene for cellulase                                        | 鲍<br><i>H. discus hannai</i>       | AB092979                             |
| E24                  | 317                     | cAMP 效应元件结合蛋白 1<br>cAMP responsive element binding protein 1                | 人<br><i>H. sapiens</i>             | NM_004379                            |
| E33                  | 505                     | 类钙调蛋白依赖蛋白激酶 IV<br>Similar to calcium/calmodulin dependent protein kinase IV | 斑马鱼<br><i>D. rerio</i>             | XM_693818                            |
| E17                  | 131                     | 文石蛋白 AP7 前体<br>Aragonite protein AP7 precursor                              | 鲍<br><i>H. rufescens</i>           | AF225916                             |
| E7                   | 421                     | 贝壳相关蛋白<br>Matrix related protein                                            | 鲍<br><i>H. discus hannai</i>       | DQ275458                             |

正常机体内存在着 2 套抗氧化防御体系:酶类和非酶系统抗氧化剂。酶系统包括谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)等;非酶系统主要指以维生素 E 为主的一些小分子的抗氧化剂,如维生素 C、 $\beta$ -胡萝卜素和谷胱甘肽(GSH)等<sup>[24]</sup>。GPX 存在于动物细胞的胞质中,以谷胱甘肽为催化底物,消除过量  $H_2O_2$  对组织造成的氧化损害;谷胱甘肽转移酶(GST)家族,也具有 GPX 的活性,这类酶是非硒依赖性的 GPX,主要防御组织内的氢基过氧化,不能直接分解  $H_2O_2$ ;过氧化氢酶以铁卟啉为辅基,催化过氧化氢分解形成  $H_2O$  和  $O_2$ <sup>[24-26]</sup>。先前的研究<sup>[4]</sup>发现,维生素 E 缺乏能够显著影响皱纹盘鲍贝

壳日增长和成活率,但对增重率没有显著影响;维生素 E 缺乏组的皱纹盘鲍肌肉中的过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和谷胱甘肽转移酶(GST)的活性均显著高于正常添加组。本研究共获得 7 种抗氧化酶的基因,包括谷胱甘肽转移酶(GST)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)以及过氧化氢酶(CAT)等,这些基因的片段出现的频率也比较高。另外,本研究结果显示,维生素 E 缺乏时,皱纹盘鲍体内的抗氧化酶基因表现出较强的差异表达,这暗示皱纹盘鲍体内的 2 套抗氧化防御系统之间存在着某种补偿的机制。

先前的研究<sup>[4]</sup>还发现,维生素 E 缺乏显著影响皱纹盘鲍贝壳中矿物质元素尤其是 Ca、Mg 的含量,同时也显著影响贝壳中文石晶体和方解石晶体的组成。本研究获得了一些与贝壳生物矿化相关的差异表达的基因,如类钙调蛋白依赖蛋白激酶、文石蛋白 AP7 前体和贝壳蛋白相关基因,这些基因都直接或间接与贝壳元素和晶体组成有一定关系。贝壳蛋白相关基因在生物矿化中所起的作用有待进一步探讨。

总之,本研究通过建立皱纹盘鲍外套膜消减 cDNA 文库,获得了部分差异表达的基因,并对其进行了初步的分析。SSH 技术虽然在筛选差异表达基因上具有明显优势,但其克隆到的只是基因片段,需要用 RACE 或者其他的方法获得基因全长,继而对基因的结构和功能进行全面分析。

#### 参考文献:

- [1] McDowell L R. Vitamin E[M]//Vitamins in animal nutrition; comparative aspects to human nutrition. San Diego: Academic Press, 1989: 93.
- [2] Devaraj S, Li D, Jialal E. The effect of alpha-tocopherol supplementation on monocyte function[J]. Clin Invest, 1996, 98: 756—763.
- [3] Chan A C. Vitamin E and atherosclerosis[J]. J Nutr, 1998, 128, 1: 593—1 596.
- [4] Fu J H, Liu J, Mai K S, et al. Effect of vitamin E on growth, survival and the activities of immune-related enzymes of abalone *Haliotis discus hannai* Ino[J]. Aquaculture, 2007. In press.
- [5] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6 025—6 030.
- [6] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high through put screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25 (13): 2 598—2 602.
- [7] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, et al. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (4): 1 116—1 123.
- [8] Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of J urkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate[J]. Anal Biochem, 1996, 240: 90—97.
- [9] Mai K S, Mercer J P. Comparative studies on the nutrition of two species of abalone *Haliotis tuberculata* L. and *Haliotis discus hannai* Ino. III: Responses of abalone to various levels of dietary lipids[J]. Aquaculture, 1995, 134: 65—80.
- [10] Salo-V?nen P, Ollilainen V, Mattila P, et al. Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction[J]. Food Chem, 2000, 71: 535—543.
- [11] 石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 银鲷肌酸激酶 M32CK cDNA 的克隆及其表达特征[J]. 动物学报, 2003, 49(5): 637—645.
- [12] 刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲷原肠期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的呈现[J]. 遗传学报, 2005, 32 (3): 253—263.
- [13] Wen J J, Xie J, Gui J F. cDNA cloning and characterization of a novel SNX gene differentially expressed in previtellogenic oocytes of gibel carp[J]. Comp Biochem Physiol, 2003, 136B(3): 451—461.
- [14] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells[J]. Acta Hydrobiol Sinica, 2003, 27 (1): 113—118.
- [15] 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.
- [16] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (3): 229—242.
- [17] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell derived chemotaxin 2, glia maturation factor beta, CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10(7): 643—650.
- [18] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of the putative carp (*Cyprinus carpio*) pre-B cell enhancing factor[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (4): 383—385.
- [19] Fujiki K, Bayne C J, Shin D H, et al. Molecular cloning of carp

- (*Cyprinus carpio*) C-type lectin and pentraxin by use of suppression subtractive hybridization[J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11(3): 275—279.
- [20] Fujiki K, Nakao M, Dixon B. Molecular cloning and characterisation of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL26 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF[J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27: 127—136.
- [21] Sangrador V A, Samuel A M M, Paul G O, et al. Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA[J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 7 031—7 037.
- [22] Sangrador V A, Lenington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization[J]. Cytokine, 2002, 17 (2): 66—70.
- [23] Liu L, Fujiki K, Dixon B, et al. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragments containing AU-rich elements[J]. Cytokine, 2002, 17 (2): 71—81.
- [24] Marchioli R. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: laboratory, epidemiological and clinical trial data[J]. Pharmacol Res, 1999, 40 (3): 227—236.
- [25] Gaetani G F, Galiano S, Canepa L, et al. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes[J]. Blood, 1989, 73: 334—339.
- [26] Sunde RA. Selenium. In: O'Dell BL, Sunde RA eds, Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements[M]. Marcel Dekker, New York, 1987, 18: 493—556.

## Construction of mantle cDNA subtractive library of *Haliotis discus hannai* Ino fed with vitamin E-deficiency diet

LIU Jing, ZHANG Wen-bing, MAI Kang-sen, FU Jing-hua, FEN Xiu-ni, MA Hong-ming, XU Wei, LIU FU Zhi-guo

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

**Abstract:** A study was conducted to clone the differentially expressed genes in the mantle of abalone *Haliotis discus hannai* during vitamin E deficiency. Juvenile abalone [initial weight ( $0.71 \pm 0.00$ ) g; initial shell length ( $15.49 \pm 0.04$ ) mm] were fed 240 d with semi-purified diets containing 2 levels of vitamin E; 3.5 mg/kg and 52.8 mg/kg. The cDNA subtractive library of the mantle of abalone vitamin E deficiency-treated was constructed using the method of suppression subtractive hybridization (SSH). The results showed that the constructed cDNA subtractive library was a highly efficient one; the cDNAs were significantly enriched for differentially expressed sequences. One hundred positive clones were randomly picked and identified by PCR method; 95% clones contained 100—900 bp inserts, which might be the cDNA fragments of differentially expressed genes in vitamin E deficiency group. Forty eight clones were sequenced, including 16 new genes, 10 glutathione-S-transferase genes, 5 glutathione peroxidase genes, 2 catalase genes, 3 hydroxysteroid dehydrogenase genes, 4 tyrosine kinase genes, 1 thyroid peroxidase-like protein gene, 3 genes for cellulose, 1 cAMP responsive element binding protein gene and 3 shell biomineralization related genes. In conclusion, the method to construct cDNA subtractive library could well reflect the gene information of abalone affected by vitamin E. Results of the present study provide the basal data to research of relationship between nutrients and gene expression of abalone. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 383—389]

**Key words:** *Haliotis discus hannai*; mantle; vitamin E; suppression subtractive hybridization; cDNA subtractive library

**Corresponding author:** ZHANG Wen-bing. E-mail: wzhang@ouc.edu.cn