

利用DD-PCR分离鳗弧菌刺激相关的牙鲆差异cDNA及表达

范玉顶^{1,2}, 陈妍婕¹, 钟其旺¹, 齐洁¹, 张全启¹

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 海洋生物遗传育种教育部重点实验室, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要: 本研究采用mRNA差异显示技术(mRNA differential display, DD-PCR)分离得到20个鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)诱导前后差异表达的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) cDNA片段。通过对差异片段进行回收、再扩增、克隆、测序、序列比对以及验证分析后, 得到9个阳性片段, 其中2个片段与已知基因高度同源, 一个与牙鲆C3补体高度同源, 同源性98%, 另一个与牙鲆TEGT(睾丸增强基因转录子)基因高度同源, 同源性98%; 其余7个为新的cDNA片段。基因表达分析表明, 这9个差异片段均在处理组、对照组的不同器官和时间段差异表达, 而且多数片段经鳗弧菌诱导后都在肝脏、肾脏、脾脏等鱼类主要免疫器官中上调表达, 初步推测它们都是和牙鲆免疫或鳗弧菌病相关的基因。对这些基因进一步的功能研究将对牙鲆的抗病育种及养殖业提供重要的参考。[中国水产科学, 2010, 17(3): 431-438]

关键词: 牙鲆; 鳗弧菌; 基因表达; mRNA差异显示; 半定量RT-PCR

中图分类号: Q781

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0431-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)是中国黄、渤海地区大面积养殖的优良品种之一, 随着牙鲆养殖业在中国的蓬勃发展, 高密度的集约化养殖增加了病原微生物感染和疾病暴发的机会, 牙鲆疾病日趋严重, 给养殖业带来了巨大的损失和危害。鳗弧菌病是一种对牙鲆危害性较大的细菌性疾病, 它主要侵害牙鲆稚鱼, 死亡率在50%以上^[1]。抗生素的使用虽可以部分解决鱼类的细菌性疾病, 但容易产生抗生素残留、环境污染以及引起鱼类的耐药性等, 而分子标记辅助育种则可以定向选育抗病新品系, 在鱼类育种中已取得了较好的效果^[2]。国内对牙鲆鳗弧菌病的研究主要集中在病原菌的分离鉴定、流行规律以及发病鱼的症状描述、组织病理学观察等方面^[3-4], 国外对虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、斑马鱼(*Brachydanio rerio*)、鲤(*Cyprinus carpio* L.)、鲶(*Clarias gariepinus*)、大西洋鲑(*Salmo salar* L.)、大西洋鳕(*Gadus morhua* L.)等鱼类的弧菌病进行了详细的研

究^[5-8]; 张玉喜等^[9]分析了牙鲆抗病鱼和不抗病鱼的MHC基因多态性, 初步筛选到抗病相关的MHC基因型; 刘云国等^[10]采用AFLP技术初步筛选到牙鲆抗病相关的分子标记, 但直接针对牙鲆鳗弧菌病相关基因的分离和筛选研究尚未见报道。

mRNA差异显示技术(mRNA differential display, DD-PCR)是由Liang和Pardee于1992年创立的对组织特异性表达基因进行分离的一种快速并行之有效的方法^[11]。本研究利用DD-PCR技术分离受鳗弧菌诱导表达的牙鲆差异cDNA片段, 以期从分子水平获得牙鲆免疫或鳗弧菌病相关的基因, 为鱼类抗病育种及海水养殖提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用的健康牙鲆取自威海养殖场, 个体大小基本一致, 平均体长约9 cm, 体质量10 g左右, 随机

收稿日期: 2009-10-08; 修订日期: 2009-11-16.

基金项目: 国家863高技术研究与发展项目(2006AA10A404); 国家自然科学基金项目(30671624, 30600455)资助.

作者简介: 范玉顶(1975-), 男, 博士. 研究方向为鱼类免疫相关基因的克隆与表达. E-mail: ydfan@sohu.com

通讯作者: 张全启, 教授, 博士生导师. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn

分成2组,每组40尾,暂养1周无任何异常后使用。鳎弧菌培养参照Chen等^[12]的方法,采用腹腔注射,每尾注射鳎弧菌悬液0.1 mL,对照组注射同等剂量的灭菌生理盐水。在注射后的6 h、12 h、24 h和48 h分别提取对照组和处理组的肝脏、肾脏、脾脏、鳃、小肠、心脏、肌肉等器官和组织,迅速放入液氮中冻存,然后转移到-80℃超低温冰箱备用。

1.2 试剂

Trizol Reagent、M-MLV 反转录酶、RNasin、DEPC、dNTP均购于Promega公司; *Taq* DNA聚合酶、DNase I、pMD18-T试剂盒购自Takara公司;其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 总RNA的提取

按Trizol说明书提取各组织总RNA,用DNase I去除RNA中残留的DNA,然后用Amersham Ultrospec 2100 Pro型分光光度计测定RNA的含量,并经1%琼脂糖凝胶电泳检测其完整性;调整体积使每个样品的RNA浓度相同,然后-80℃保存备用。

1.4 cDNA的合成

以纯化后RNA作为反转录模板,合成cDNA的第一链,反应体系(20 μL)及步骤如下: 1) 2.0 μg总RNA, 锚定引物(20 μmol/L) 5 μL, 混合后70℃水浴5 min, 立即置冰上; 2) 向反应体系中依次加入5×M-MLV buffer 5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 5 μL, RNasin(40 U/μL) 0.7 μL, M-MLV(200 U/μL) 1 μL, 补加DEPC水使总体积为20 μL, 充分混合, 42℃, 1 h; 3) 95℃, 5 min灭活逆转录酶, 终止反应, -20℃保存备用。

1.5 引物设计、PCR扩增及电泳

选用3个3'末端锚定引物(HT11A/C/G)和8个5'末端随机引物(APn, n=9~16)进行DD-PCR反应, 引物由上海生物工程公司合成, 具体引物序列见表1。

20 μL的PCR体系包括: 1.4中的cDNA 1 μL, 锚定引物(2 μmol/L)和随机引物(2 μmol/L)各2 μL, MgCl₂(25 mmol/L) 1.6 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 1.6 μL, 10×PCR buffer 2 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.2 μL, ddH₂O 9.6 μL。扩增条件如下: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 41℃ 2 min, 72℃ 1.5 min, 共30个循环; 72℃ 10 min。

表1 PCR引物序列
Tab. 1 The sequences of PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
HT11A	AAGCTTTTTTTTTTTA
HT11C	AAGCTTTTTTTTTTTC
HT11G	AAGCTTTTTTTTTTTG
AP9	AAGCTTCATTCCG
AP10	AAGCTTCACGTA
AP11	AAGCTTCGGGTAA
AP12	AAGCTTGAGTGCT
AP13	AAGCTTCGGCATA
AP14	AAGCTTGGAGCTT
AP15	AAGCTTACGCAAC
AP16	AAGCTTTAGAGCG

扩增结束后,在PCR产物中加入等体积的变性缓冲液,94℃变性5 min,冰上骤冷,取5 μL上样,于6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,凝胶用银染法显色。

1.6 差异片段的回收、克隆及测序

用刀片从凝胶上切下差异带并置于离心管中捣碎,加20 μL双蒸水,4℃过夜;离心后取4 μL上清作为模板进行二次PCR,反应条件同1.5,1.5%琼脂糖电泳检测。取二次扩增后单一条带的PCR产物1.5 μL直接和pMD18-T连接(参照试剂盒使用说明),5 μL连接产物转化DH 5α感受态细胞,涂布含100 mg/mL氨苄青霉素的LB琼脂培养板(含X-gal和IPTG),过夜培养;挑白斑进行菌落PCR; *Mse* I及 *Taq* I酶切菌落PCR产物以鉴定菌斑的一致性;然后选一致性高的菌落送上海博雅公司测序;将测序结果与GenBank中相应序列进行同源性比较。

1.7 差异片段的验证及组织表达分析

此步骤采用半定量RT-PCR(Semi-quantitative RT-PCR)进行,具体做法为:取对照组及鳎弧菌诱导组牙鲆不同组织的总RNA各2 μg,利用随机引物反转录成20 μL的cDNA溶液,根据1.6中各差异片段的测序结果分别设计基因特异性引物,以 *β-actin* 为内参,PCR之后经琼脂糖凝胶电泳检测各差异片段在对照组及诱导组中的表达情况,如

果差异片段表达量的变化与PAGE胶上的结果一致,则视为阳性,反之则为假阳性;进而再用半定量RT-PCR对获得的阳性片段在不同组织和诱导时间下的表达谱进行研究。25 μ L RT-PC反应体系: 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, Primer (5 mmol/L) 0.5 μ L, Taq酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O补至25 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,纯化、测序以确定所扩增片段是否为目的片段。其中内参

β -actin扩增25个循环,所用引物序列为: β -actin F, 5'-GAGATGAAGCCCAGAGCAAGAG-3'; β -actin R, 5'-CAGCTGTGGTGGTGAAGGACTAG-3'。

2 结果与分析

2.1 mRNA差异显示分析

采用3个锚定引物、8个随机引物共24个引物组合,分别对鳎弧菌处理组和对照组肝、肾、脾3个器官在4个时间段(6 h、12 h、24 h和48 h)下的混合RNA进行DD-PCR分析,图1为部分差异片段mRNA差异显示的典型图谱。

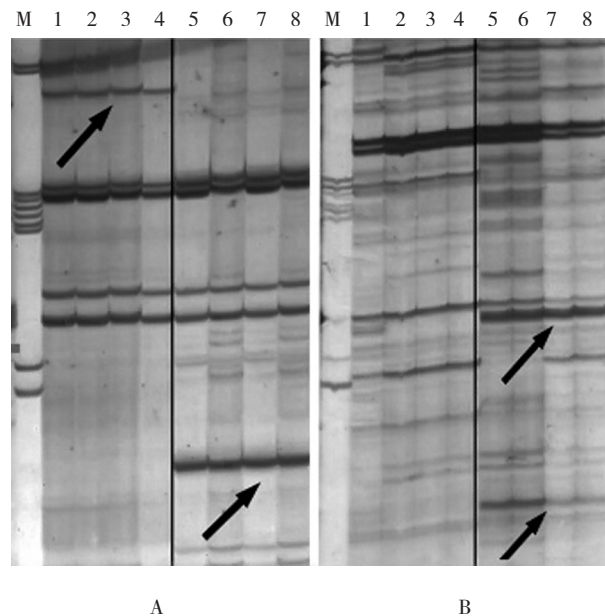


图1 对鳎弧菌处理组和对照组牙鲆mRNA差异显示的部分结果

A: 肝; B: 肾. M: ϕ X174; 1-4: 对照组6 h、12 h、24 h、48 h样品; 5-8: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h样品. 箭头所指为差异表达片段.

Fig. 1 Partial results of mRNA differential display on flounder of *Vibrio anguillarum* treated group and control group

A: liver; B: kidney. M: marker ϕ X174; 1-4: sample of control group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; 5-8: samples of treated group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h. Differentially expressed fragments are shown by arrows.

共得到20个较稳定表达的差异片段(表2),按其在对照组和处理组中的表达差异情况可分为4类: 1)在对照组中高表达有2条(10%); 2)在处理组中高表达有9条(45%); 3)只在对照组中表达有2条(10%); 4)只在处理组中表达有7条(35%)。

2.2 差异片段的回收、克隆及测序

对PAGE胶上回收的差异片段进行二次扩增,用

1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,均得到单一条带,而且片段大部分集中在200~300 bp之间。对二次扩增产物回收、克隆并测序,序列比对结果表明,20个差异片段中,有2个片段C143和C153分别与牙鲆C3补体(Complement component 3)、TEGT(Testis-enhanced gene transcript)基因高度同源,序列相似性均为98%;其余18个片段没找到与之相似性较高的基因。

表2 鳎弧菌处理组和对照组牙鲆的差异表达片段
Tab. 2 Differentially expressed fragments in flounders of *Vibrio anguillarum* treated group and control group

编号 No.	片段名称 Fragment name	引物 Primer	器官 Organ	对照组 Control group	处理组 Treated group
1	<u>A151</u>	HT ₁₁ A-AP ₁₅	肝、肾、脾 Liver, kidney, spleen	++	+
2	<u>G122</u>	HT ₁₁ G-AP ₁₂	肝 Liver	++	+
3	<u>C123</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₂	肝、肾、脾 Liver, kidney, spleen	+	++
4	<u>C132</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₃	肝 Liver	+	++
5	<u>C143</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₄	肝 Liver	+	++
6	<u>C153</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₅	肝、肾 Liver, kidney	+	++
7	<u>C154</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₅	肝 Liver	+	++
8	<u>C161</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₆	肝 Liver	+	++
9	<u>C165</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₆	肝 Liver	+	++
10	<u>G931</u>	HT ₁₁ G-AP ₉	肝 Liver	+	++
11	<u>G932</u>	HT ₁₁ G-AP ₉	肝 Liver	+	++
12	<u>C121</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₂	肾 Kidney	+	-
13	<u>C162</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₆	肝 Liver	+	-
14	<u>A101</u>	HT ₁₁ A-AP ₁₀	肾、脾 Kidney, spleen	-	+
15	<u>A111</u>	HT ₁₁ A-AP ₁₁	肝 Liver	-	+
16	<u>A142</u>	HT ₁₁ A-AP ₁₄	肝 Liver	-	+
17	<u>C133</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₃	肾、脾 Kidney, spleen	-	+
18	<u>C134</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₃	肾、脾 Kidney, spleen	-	+
19	<u>C166</u>	HT ₁₁ C-AP ₁₆	肾 Kidney	-	+
20	<u>G123</u>	HT ₁₁ G-AP ₁₂	脾 Spleen	-	+

注: -: 没有表达; +: 表达; ++: 高表达; 有下划线的片段为阳性片段.

Note: -: no express; +: express; ++: high express; Fragments with underlines are positive ones.

2.3 差异片段的RT-PCR验证

半定量RT-PCR的分析结果表明,20个差异片段中有9个片段(表2)为阳性片段,阳性率为45%;

它们在处理组和对照组的肝、肾、脾之间有明显的差异表达,而且其表达量的变化与DD-PCR结果基本一致,图2为部分差异片段验证分析的典型图谱。

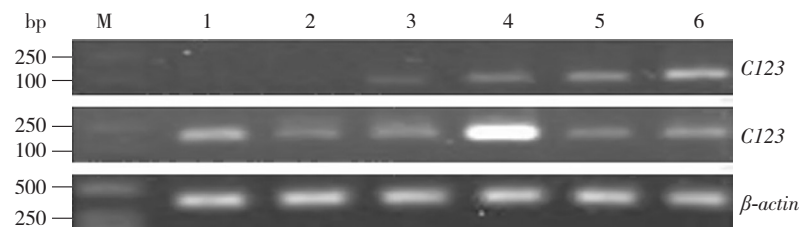


图2 部分差异片段的RT-PCR验证结果

M: Marker ØX174; 1-3: 对照组肝脏、肾脏、脾脏; 4-6: 处理组肝脏、肾脏、脾脏.

Fig. 2 Identification of partial differential fragments using RT-PCR

M: marker ØX174; 1-3: liver, kidney and spleen of control group; 4-6: liver, kidney and spleen of treated group.

2.4 基因表达分析结果

为进一步了解差异片段在不同组织和时间段的表达情况,利用半定量RT-PCR对9个阳性片段在处理

后的4个时间段(6 h、12 h、24 h、48 h)、7种组织(肝脏、肾脏、脾脏、鳃、小肠、心脏、肌肉)中的表达特点进行了研究,图3是部分差异片段基因表达的典型图谱。

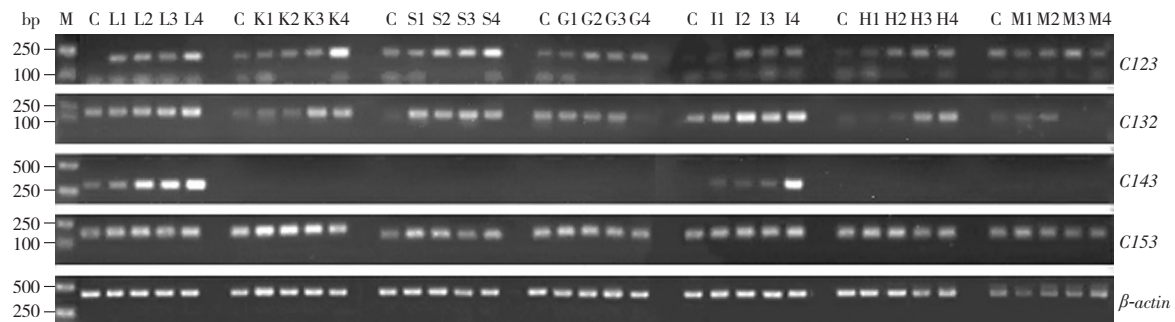


图3 部分差异片段的基因表达图谱

M: Marker ØX174; C: 对照组; L1-L4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h肝脏样品; K1-K4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h肾脏样品; S1-S4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h脾脏样品; G1-G4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h鳃样品; I1-I4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h肠样品; H1-H4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h心脏样品; M1-M4: 处理组6 h、12 h、24 h、48 h肌肉样品。

Fig. 3 Gene expression profile of partial differential fragments

M: marker ØX174; C: control group; L1-L4: liver of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; K1-K4: kidney of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; S1-S4: spleen of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; G1-G4: gill of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; I1-I4: intestine of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; H1-H4: heart of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h; M1-M4: muscle of treatment group at 6 h, 12 h, 24 h, 48 h.

多数差异片段在不同时间和组织中的表达呈现出明显的规律和特点,如差异片段C123在对照组的肝、肾、脾、小肠、心脏中几乎没有表达或表达量很小,注射鳃弧菌之后其表达量明显增加,注射后48 h的表达量最大,在肝、肾、脾中的表达尤为明显;差异片段C132在处理组肝、肾、脾、心脏中的表达明显增强,而且随时间延长,其表达量逐渐增加,在肝脏中的表现较为明显;与牙鲆C3补体高度同源的片段C143只在处理组和对照组中的肝脏和小肠中表达,在其他组织中检测不到表达,而且随时间延长,在处理组肝脏中的表达量逐渐增加。与TEGT基因高度同源的片段C153在肝、肾、脾、鳃、小肠、心脏、肌肉等7个组织中均有表达,鳃弧菌处理6 h后,在以上组织中的表达量均明显增加,在肾脏中表达最强,此后随时间的延长,其表达量又呈现下降的趋势。

3 讨论

筛选差异表达基因的方法很多, DD-PCR由于具有起始RNA用量少、敏感度高、简单迅速、可同时

比较多个样品等优点而得到了更为广泛的应用,尤其在寻找与疾病相关基因方面发挥着不可替代的作用。但许多科研实践证明,该技术也存在一定缺陷: 1) 假阳性高达70%; 2) 得到的差异片段局限于3'端,长度较短,大多在100~500 bp范围内,且为3'端非编码区; 3) 使用放射性同位素,易造成放射性污染^[13]。针对上述缺点,本实验做了如下改进: 1) 使用AgNO₃银染凝胶代替传统的同位素显色,在保证高灵敏度的同时,排除了放射性污染; 2) 是使用DNase I消除混有的DNA污染; 3) 设2~3次重复,选择重复性好、稳定表达的差异条带; 4) 引物设计方面,添加酶切位点,增加引物长度,从而提高扩增特异性。经过以上改进,得到了较清晰的稳定表达的差异条带,阳性片段所占的比例为45%,假阳性为55%,相比前人报道的70%的假阳性,本实验在一定程度上降低了假阳性的比例。

本研究通过DD-PCR得到的9个阳性片段中,有5个片段(55.56%)在对照组中低表达,在处理组中高表达; 3个片段在对照组中不表达,在处理组

中表达;1个片段在对照组中高表达,处理后表达量降低,因此所获得的阳性片段中以鳃弧菌刺激后表达量增加的类型为主。在2个与已知基因高度同源的片段中,片段*C143*与牙鲆C3补体基因相似性为98%,C3是补体系统的中心成分,补体系统是免疫防御中重要的体液功能分子,在被病原体或者抗原抗体复合物等多种物质激活后,能诱导炎症反应和抗体的形成,介导病原体的清除^[14]。已有研究表明,在硬骨鱼类中,补体除了具有溶菌、中和外毒素^[15]、溶解寄生虫^[16]等直接的抗微生物作用外,还显示出对吞噬细胞吞噬活性的促进作用,即所谓调理作用^[17]。本实验对C3补体在鳃弧菌处理前后不同组织和时间的表达研究表明,C3补体只在处理组和对照组中的肝脏和小肠中有表达,而且在对照组中是微量表达,注射鳃弧菌之后,随时间延长,在C3补体处理组中的表达量逐渐增加,在肝脏中的表达尤为明显。Lamas等^[18]研究表明,鳃弧菌主要在虹鳟的肝脏和脾脏中增殖并引起这些组织的病变;另外,昌鸣先等^[19]研究表明,在对照组草鱼的肝组织中检测不到补体C3的表达,而在感染有大中华鲈(*Sinergasilus major*)的草鱼肝组织中,检测到草鱼补体C3的大量表达,这些研究结果都与本研究结论有相似之处。据此笔者推测C3补体可能是和牙鲆抗鳃弧菌病相关的一个基因,正常情况下,它在肝脏中微量存在,一旦受到病原菌或寄生虫的侵染,肝脏则大量合成C3补体来实施抵御;C3补体在牙鲆鳃弧菌病中的具体作用机制还有待于进一步研究。

差异片段*C153*与*TEGT*基因高度同源,*TEGT*基因即Bax inhibitor-1 (BI-1)基因,是一种凋亡抑制基因,由Walter等^[20]于1994年在小鼠睾丸表达库中克隆得到,它广泛地分布于人体的心脏、脑、肝、骨骼肌、肾以及胰腺中,且在這些组织中表达量都很高。已有研究表明,BI-1是由Bcl-1和Bax调控的细胞死亡通路上的一个新型调节因子,可以抑制由Bax、etoposide、staurosporine、growth factor deprivation引起的凋亡^[21];其过量表达与肿瘤的发生及转移密切相关,Michal等^[22]对17对前列腺癌及相对应的正

常组织、5对前列腺良性肿瘤及正常组织进行扩增,发现与正常组织相比,11/17例在癌组织中明显高表达,而在良性肿瘤中BI-1表达量无显著差异。*TEGT*基因在鱼类组织中的表达尚未见报道,本研究结果表明,*TEGT*基因在鳃弧菌处理6 h后其表达量明显增加,此后随时间延长表达量呈现下降的趋势。因此可以初步推测*TEGT*也是和牙鲆抗鳃弧菌病相关的1个基因,是生物受到外界刺激后启动的特异或相应基因以抵抗病原菌的侵袭。

对于其他7个没有找到与已知基因同源的阳性片段,经RT-PCR研究表明,它们在鳃弧菌处理组中的表达量也明显增加,因此可以初步推测它们可能是与牙鲆抗鳃弧菌病相关的新基因片段。由于受到DD-PCR技术本身的限制,所得片段较短,而且多位于3'端非编码区,所以目前尚无法得到这些片段的更多信息,其在牙鲆抗鳃弧菌病中的功能和作用有待于利用RACE (Rapid amplification of cDNA ends)等技术获得其全长cDNA后做进一步的分析和验证。

参考文献:

- [1] 周丽,宫庆礼,俞开康. 牙鲆的疾病[J]. 中国海洋大学学报, 1997,27(2): 173-180.
- [2] 鲁翠云,曹顶臣,孙效文,等. 微卫星分子标记辅助镜鲤家系构建[J]. 中国水产科学,2008,15,6: 893-901.
- [3] 夏永娟,黄威权,姜国良. 鳃弧菌感染牙鲆的组织学和免疫组织化学观察[J]. 海洋科学,2000,24(10): 41-43.
- [4] 莫照兰,陈师勇,谭训刚,等. 养殖牙鲆细菌性病原分离与鉴定[J]. 海洋科学,2003,45: 164-168.
- [5] Arnesen S M, Schröder M B, Dalmo R A, et al. Antigen uptake and immunoglobulin production in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) after intraperitoneal injection of *Vibrio anguillarum* [J]. Fish Shellfish Immunol,2002,13: 159-170.
- [6] O'Toole R, von Hofstena J, Rosqvista R, et al. Visualization of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum* [J]. Microbial. Pathogenesis,2004,37: 41-46.
- [7] Vervaeke S, Ollevier F, Kingeta R, et al. Mucosal response in African catfish after administration of *Vibrio anguillarum* O₂ antigens via different routes [J]. Fish Shellfish Immunol,2005,18: 125-133.

- [8] Park K C, Osborne J A, Tsoi S, et al. Expressed sequence tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18: 393–415.
- [9] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆MHCII B 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的研究[J]. 水产学报, 2006, 30(5): 633–639.
- [10] 刘云国, 陈松林, 刘占江. 牙鲆抗鳎弧菌病 AFLP 分子标记的筛选[J]. 中国水产科学, 2007, 14: 155–159.
- [11] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic mRNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257: 967–971.
- [12] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning and characterization of natural resistance associated macrophage protein (Nramp) cDNA from red sea bream (*Pagrus major*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2004, 17(4): 305–313.
- [13] Miele G, Macrae L, McBride D, et al. Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA [J]. Biotechniques, 1998, 25(1): 138–144.
- [14] Kasahara M, Nakaya J, Satta Y, et al. Chromosomal duplication and the emergence of the adaptive immune system [J]. Trends Genet, 1997, 13: 90–92.
- [15] Sakai D K. The non-specific activation of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, complement by *Aeromonas salmonicida* extracellular products and the correlation of complement activity with the inactivation of lethal toxicity products [J]. J Fish Dis, 1984, 7: 329.
- [16] Bower S M. Acquired and innate resistance to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) [J]. Dev Comp Immunol, 1988, 12: 749.
- [17] Sakai D K. Osponization by fish antibody and complement in the immune phagocytosis by peritoneal exudates cells isolated from salmonid fishes [J]. J Fish Dis, 1984, 7: 29.
- [18] Lamas J, Santos Y, Bruno D, et al. A comparison of pathological change caused by *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Fish Pathol, 1994, 29: 79–89.
- [19] 昌鸣先, 裴品. 草鱼补体 C3 基因的克隆及在感染大中华鲮草鱼个体的表达分析[J]. 自然科学进展, 2004, 14(8): 870–881.
- [20] Walter L, Dirks B, Rothermel E, et al. A novel, conserved gene of the rat that is developmentally regulated in the testis [J]. Mamm Genome, 1994, 5(4): 216–221.
- [21] Xu Q, Reed J C. Bax Inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast [J]. Mol Cell, 1998, 1: 337–346.
- [22] Grzmil M, Thelen P, Hemmerlein B, et al. Bax Inhibitor-1 is overexpressed in prostate cancer and its specific down-regulation by RNA interference leads to cell death in human prostate carcinoma cells [J]. Am J Pathol, 2003, 163(2): 543–552.

Isolation and expression of differentially expressed cDNA in *Paralichthys olivaceus* induced by *Vibrio anguillarum* with DD-PCR

FAN Yuding^{1,2}, CHEN Yanjie¹, ZHONG Qiwang¹, QI Jie¹, ZHANG Quanqi¹

(1.Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education; Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2.Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: Due to the good taste and nutritional value, Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* is one of the most important marine aquaculture species and is widely cultured along northern coastal areas in China. *Vibrio anguillarum* is the main causative agent of vibriosis which is a highly significant disease for cultured and wild marine fish, including Japanese flounder. Vibriosis has resulted in severe economic losses, which hindered the development of aquaculture. The use of antibiotics could partially solve the problem, but bring risks of antibiotic residues in fish, environmental pollution, and antibiotic resistance development. To obtain genes associated with *Vibrio anguillarum* disease and provide references for molecular marker-assisted selective breeding of Japanese flounder, the mRNA differential display technique (DD-PCR) was performed to identify and isolate differentially expressed cDNAs representing transcripts from *Paralichthys olivaceus* challenged by *Vibrio anguillarum*. Total 20 cDNA fragments were recovered, cloned and sequenced, of which nine were confirmed to be positive fragments, after elimination of false-positives by Semi-quantitative RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) expression studies. Among these nine positive fragments, BLAST analysis indicated that two of them shared high homology with known genes. One was homologous with complement component 3 gene (98% identity), the other showed 98% identity with *TEGT* (testis-enhanced gene transcript) gene, while the others were new cDNA fragments and had no high homologous genes in GenBank database. RT-PCR analysis showed that these nine positive fragments differentially expressed in different organisms and times between *Vibrio anguillarum* treated group and control group, and expressions of most fragments increased in main fish immune organs such as liver, kidney and spleen after infection, so these fragments maybe *Vibrio anguillarum*-resistance associated genes of *Paralichthys olivaceus*. Further research on the functions of these genes will provide important reference for molecular marker-assisted selective breeding of Japanese flounder. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 431–438]

Key words: *Paralichthys olivaceus*; *Vibrio anguillarum*; gene expression; mRNA differential display; semi-quantitative RT-PCR

Corresponding author: ZHANG Quanqi. E-mail: qzhang@ouc.edu.cn