

皱纹盘鲍群体选育第四代成鲍 4 种多糖裂解酶基因表达的初步研究

何庆国^{1,2}, 王劭雯^{1,2}, 李加琦^{1,2}, 刘 晓¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 根据已发表 cDNA 序列设计引物扩增了 2 龄皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)的褐藻酸酶、海带淀粉酶、 α -淀粉酶和纤维素酶基因片段并测定其序列, 同时用半定量反转录 PCR 和实时荧光定量 PCR 技术分析它们在不同组织中的表达。结果表明: 以 cDNA 为模板的 PCR 产物序列与已发表的相应基因序列一致; 以 DNA 为模板扩增的 α -淀粉酶和纤维素酶基因片段分别含 438 bp 和 667 bp 的内含子; 在纤维素酶基因片段的外显子和内含子区各检测到 2 个 SNP; 4 种多糖裂解酶基因均主要在消化腺中表达, 褐藻酸酶基因的表达最强, 其次为纤维素酶, 表明在摄食海带的条件下, 褐藻酸酶是成体皱纹盘鲍可利用的最重要多糖类物质之一。本文的结果为进一步开展皱纹盘鲍“97”选育群体在不同发育期、摄食不同藻类及不同培育环境下的多糖水解酶基因表达研究奠定了基础。

关键词: 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino); 褐藻酸酶; 淀粉酶; 纤维素酶; 基因表达

中图分类号: S968.31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)11-0007-06

doi: 10.11759/hyxx20150612

藻类是皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)最重要的天然食物。鲍幼体阶段主要摄食底栖硅藻, 幼鲍和成鲍则主要摄食褐藻、红藻、绿藻等大型藻类。人工养鲍时, 海带(*Laminaria japonica*)是皱纹盘鲍最常用的饲料^[1-2]。藻类的主要成分是多糖, 而皱纹盘鲍的多糖裂解酶在消化利用多糖类物质的过程中起关键作用。鲍的多糖裂解酶很早就受到人们关注, 1978 年 Clark 等^[3]报道了彩虹鲍(*H. iris*)消化腺提取液对 14 种多糖底物的水解酶活性, 并探讨了这些酶作为商用酶制剂的可能性。此后, 中国学者也陆续报道了对皱纹盘鲍^[4-7]和杂色鲍^[8-10]多糖裂解酶的相关研究结果, 但上述研究均着眼于酶的活性或理化性质, 对它们的表达调控相关知识的了解仍很欠缺。

近 10 年来, 皱纹盘鲍褐藻酸酶(hdaly)^[11]、海带淀粉酶(hdlam)^[12]、纤维素酶(hdcel)^[13]和盘鲍(*H. discus discus*) α -淀粉酶(hdamy1)^[14]与纤维素酶^[15]基因的 cDNA 全长序列相继发表。为探讨皱纹盘鲍对多糖类物质的消化利用状况, 作者根据已发表序列信息设计了相关引物, 尝试在 mRNA 水平研究这些酶的表达调控^[16]。本研究使用的实验材料是中国科学院海洋研究所和大连市水产研究所培育的皱纹盘鲍“97”群体的选育第四代。该选育群体始建于 1997 年, 是以中国野生群体为母本与从日本岩手县引进

的皱纹盘鲍进行群体间杂交培育的杂交苗种经过连续高强度选育而培育的皱纹盘鲍选育系。皱纹盘鲍“97”选育群体具有存活率高、适温范围广、生长速度快、整齐度高等特点^[17], 作者从 2008 年开始对该选育群体开展了一系列的生理研究^[16-18], 本文报道对皱纹盘鲍“97”选育群体 2 龄成体消化酶基因表达研究的部分结果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

供试样品为皱纹盘鲍“97”群体选育第 4 代的 2 龄成鲍, 平均壳长为(63.38 ± 4.08)mm, 活体平均体重为(28.9 ± 6.4)g。所用群体于 2008 年 4 月在山东荣成寻山渔业集团总公司繁殖, 经福建宁德海区完成越冬培育后在荣成桑沟湾海区笼养至次年 11 月, 海区养殖期间投喂的饵料为海带。2009 年 12 月至翌年 4 月, 在中国科学院海洋研究所水族楼的循环水养殖系统中培育, 期间每日投喂新鲜海带, 由中科海 WK-3000 控温仪(控温精度 ≤ ±0.1 °C)与加热棒调节培

收稿日期: 2015-05-05; 修回日期: 2015-07-30

基金项目: 国家 863 计划项目(2012AA10A412)

作者简介: 何庆国(1986-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产动物分子遗传学研究; 刘晓, 通信作者, 研究员, E-mail: liuxiao@qdio.ac.cn

育水温在(20±0.5)℃。

1.2 取样

在20℃恒温培育120 d后取部分个体, 逐个编号后分离每个个体的各种组织, 用 RNAsave 试剂保存分离组织用于提取 RNA, 同时取足部肌肉于-80℃冻存用于提取 DNA。

1.3 DNA 和总 RNA 的提取

随机取4个个体的足部肌肉组织, 采用 SQ 组织 DNA 提取试剂盒(Omega 公司产品)提取 DNA。同时,

分别取上述个体的消化腺、足部肌肉组织、外套膜、触手、鳃组织, 采用总 RNA 提取试剂盒(BioFlux 公司产品)提取总 RNA, 逆转录后的产物于 -20℃冻存备用。

1.4 荧光定量 PCR 引物设计

根据已发表的皱纹盘鲍 β-actin、褐藻酸酶、海带淀粉酶、纤维素酶基因和盘鲍 α-淀粉酶基因的 cDNA 序列信息, 应用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, 引物信息见表 1。

表 1 引物相关信息

Tab.1 Primers used in this study

基因	酶编号	引物序列(5'-3')	基因注册号	引物位置	产物长度
β-actin	—	F: GGTATCCTCACCTCAAGT R: GGGTCATCTTTTCACGGTTG	AY380809.1	269~443	175bp
褐藻酸酶	EC 4.2.2.3	F: TGGAAGGCACTCGGACAAC R: GGTCGCAGAAACCGTCAATC	AB110094.1	401~516	116bp
海带淀粉酶	EC 3.2.1.6	F: GGCGTTGACCGTGTCTTGT R: GATGACTGGCTGGTTGTCTATGT	AB488493	636~812	177bp
α-淀粉酶	EC 3.2.1.1	F: CAACCAAGCCAACACTGAC R: CTGAGCCTGACCACCAAT	EF103352.1	1092~1279	188bp
纤维素酶	EC 3.2.1.4	F: GACGGAGGTGGAGGGCTTCT R: GTTACAGTGTCATACCCGCATC	AB125892.1	1306~1467	162bp

1.5 扩增产物的克隆测序

以皱纹盘鲍的 DNA 和 cDNA 为模板, 分别使用表 1 中的引物进行 PCR 扩增, 反应体系 20 μL, 含 cDNA 2.5 ng, 正反向引物各 10 μmol/L, Taq 酶 0.5U。扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 目标条带回收后连接到质粒载体 pMD18-T 上, 转化 *E.coli* Trans1-T1, 经 LB 固体培养基 37℃ 培养 12~14h 后, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 阳性克隆在 LB 液体培养基中 37℃ 振荡培养 5~6h, 送交华大基因公司测序。

1.6 半定量 PCR 分析

以不同组织的 cDNA 为模板, 对 4 种多糖裂解酶基因进行半定量 PCR 分析。反应体系和条件同 1.5。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 荧光定量 PCR 分析

标准曲线: 对已知浓度的皱纹盘鲍消化腺 cDNA 进行 5 倍比例稀释, 共稀释成 4 个浓度, 每个浓度 2 次重复, 进行 PCR 扩增。以 Ct 值为纵坐标,

起始模板浓度的对数值为横坐标建立标准曲线。

以皱纹盘鲍不同组织 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增, 每个反应重复 4 次。反应体系如下: cDNA 1 μL, 正反向引物各 1 μL (10 μmol/L), 2× SYBR Green 预混液 10 μL, 加双蒸水到 20 μL。采用二步法进行扩增: 95℃ 预变性 30 s 后, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 共 40 个循环。

1.8 数据处理与分析

通过对荧光定量 PCR 反应体系进行优化, 使扩增效率为 95%~105%, 采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算各目的基因相对于看家基因的表达量^[18-19]。扩增效率 $E=10^{-1/K} - 1$ (K 为标准曲线的斜率)。

数据显著性采用 SPSS(Ver.11.5) 软件进行统计分析。所有实验数据均以平均值±标准误 ($\bar{x} \pm SE$) 来表示。对测序结果, 应用 NCBI 网站上的 BLAST 工具与 GenBank 数据库中的目的基因序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 扩增效率及熔解曲线分析

经电泳检测, β-actin、hdaly、hdlam、hdamyl 和

hdcel 的扩增效率分别为 96.6%、101.3%、104.4%、93.4%、96.4%。熔解曲线峰值基本一致, 无杂峰, 产物特异度好。

2.2 4 种多糖裂解酶基因的扩增结果

以皱纹盘鲍肌肉组织 DNA 和消化腺 cDNA 为模板, 分别用表 1 所列引物进行扩增。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果见图 1。由图 1 可知, β -actin 和 4 种多糖裂解酶基因的扩增产物条带清晰单一, 未见非特异性扩增; 以 cDNA 为模板所得扩增片段在 100~200bp 范围内, 长度与预期一致; 以 DNA 为模板扩增时, 褐藻酸酶与海带淀粉酶基因的产物与 cDNA 模板所得产物大小相近, 但 α -淀粉酶和纤维素酶基因的扩增产物分别在 600bp 和 800bp 左右, 远大于以 cDNA 为模板的产物, 推测该区域存在内含子序列。

2.3 扩增产物的序列和 SNP

将图 1 中 P₁-P₉ 的产物分别克隆, 各取 2 个克隆测序。经生物信息学分析知: (1)用 cDNA 模板分别扩增得到 β -actin 基因、褐藻酸酶(hdaly)、海带淀粉酶(hdlam)、 α -淀粉酶(hdamyl)及纤维素酶(hdcel)基因片段的长度分别为 175 bp、116 bp、177 bp、188 bp 和 162bp, 产物长度符合预期, 除纤维素酶基因片段存在 2 个碱基差异外, 其他基因片段与盘鲍或皱纹盘鲍已发表基因的相应片段一致; (2)纤维素酶基因片段的 2 个碱基差异位于其 DNA 全长序列(AB125892.1) 的第 8349 和第 8361 处, 分别是甘氨酸和苏氨酸密码子的末位碱基, 甘氨酸密码子由 GGC 变为 GGT, 苏

氨酸由 ACT 变为 ACC(图 2), 均属同义突变; (3)用 DNA 模板得到的纤维素酶(图 2)和 α -淀粉酶(图 3)基因片段分别为 829bp 和 626bp, 生物信息学分析确认分别包含 667bp 和 438bp 的内含子序列。纤维素酶基因的内含子序列与已发表序列相比, 存在 2 个 SNP(插入 2 个碱基)。

2.4 皱纹盘鲍多糖裂解酶基因表达的组织特异性

皱纹盘鲍不同组织的 cDNA 用表 1 所列引物扩增结果见图 4。可见内参基因 β -actin 在不同组织中的扩增产物亮度基本一致, 但纤维素酶(hdcel)、 α -淀粉酶(hdamyl)、褐藻酸酶(hdaly)和海带淀粉酶(hdlam)基因的扩增产物量在相同个体的不同组织间有极显著差异, 均主要在消化腺中表达。但在鳃、足部肌肉组织、触手和外套膜中也能检测到 α -淀粉酶(hdamyl)基因的微弱信号。

2.5 皱纹盘鲍 4 种多糖裂解酶基因组织特异性表达的定量检测

用 Real-time PCR 检测 4 种多糖裂解酶基因在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量, 结果如表 2 所示。可见, 4 种多糖裂解酶基因在消化腺中的相对表达量极显著地高于其他组织, 相反, 在鳃、足部肌肉组织、外套膜和触手等组织中的表达量则极低。并且, 消化腺中 4 种多糖裂解酶基因的相对表达量依次为褐藻酸酶 > 纤维素酶 > α -淀粉酶 > 海带淀粉酶。此外, 褐藻酸酶和纤维素酶基因的表达量极显著地高于 α -淀粉酶和海带淀粉酶($P < 0.01$)。

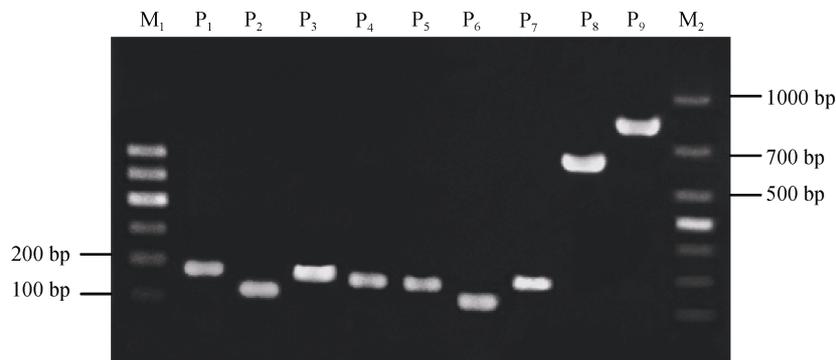


图 1 β -actin、hdaly、hdlam、hdamyl 和 hdcel 的扩增结果

Fig.1 PCR products of β -actin, hdaly, hdlam, hdamyl and hdcel gene

P₁ 为 β -actin, P₂-P₅、P₆-P₉ 依次为 hdaly、hdlam、hdamyl 和 hdcel。P₁-P₅ 以 cDNA 为模板, P₆-P₉ 以 DNA 为模板。M₁ 和 M₂ 均为分子质量标准

Lane P₁: PCR products generated by β -actin. Lanes P₂-P₅: PCR products generated by hdaly, hdlam, hdamyl and hdcel gene as cDNA template respectively. Lanes P₆-P₉: PCR product generated by hdaly, hdlam, hdamyl and hdcel gene as DNA template respectively

```

8330 TC AAG GGC TGG CTC CCT GG GGC TCC ATC AC TAC ACT CCA TGC GGA CAG GCG
425 K G W L P G G S I T Y T P C G Q A
8383 TGG AGA GAC AAG TGG GGC TCC AAC AGA TAT GCA GGTC AATCTACTAGGCATAACAT
442 W R D K W G S N R Y A A
8439 TTAGGCGTATTTTCATTTTAAAAACAAATGGGGTGCGAAAATAATAAAAAGCAATTCTTCAT
8500 AATCACGATAGGAGTCCACGGCTCTGTTGAGAGAACTTAAATGCGTGAATTAATAGTTA
8560 ATAATTACAACATGAAATCAGCATGAAAATGTACCTAGCTAGTGTACGTATTCCGCCAGTGT
8621 GCAAGAATAACAAGAACCTGAGCTTATTGTAGATGATCTTAGCTACGACCCATAAATGAT
8682 CAATATAAAGAAATGCACTAAACAAGAAATACATTTCCGGTGAAGTAACCCTATGATAAGAG
8743 TGCCATTTGCTTAATTTCCCCAGCAGTTGTACCTTTTACGCCGAATGGAATCTGTTTCAAC
8804 AGATGATCGAGACTGACAATGGCTAAGTGGGAAAGTTGTATTTCATGTCAAAGAGTTTTTTT
8864 GCAATCAGGAAAATAGAGGAGTTGCTAGCGGATGCATGTAGTAATAAGGTGAGGAC TT
8923 ATAGGTTTCATTTTCGTA AAAACAAATTTAATCAGTTGCACTTTGGTCATGTTGTACAAG
8984 ACCAAAATGTCTAGAAATATAAACGCCAACATAGACTTGATGTTCACTGTATGTTACAAA
9044 GTATCCCTTTGACTGGGCTTGTGCTTTTACTCTGCAGCC AAC TCT GCA TTC GCC GCT
454 N S A F A A
9103 CTG GTG GCT GCT
461 L V A A
    
```

图 2 纤维素酶基因 DNA 扩增产物的序列分析

Fig.2 Sequence analysis of DNA amplification products of cellulase gene
 外显子部分的白色方框标记为 SNP 位点; 内含子部分的灰色方框标记为插入的 2 个碱基。
 The white parts in exon are the two SNP loci. The gray parts in intron are the two inserted bases.

```

1111 CAA GGA CCC CCT CAG AAC GGC GAC ATG AGT ACT AAG CCG GTA ACC ATC AAGTATG
365 Q G P P Q N G D M S T K P V T I N
TAAAGTATATCCAGGATCCAATATACACTTTATGTTTCAGATCTTCTCTACCTTTCCCTTGTC
TAAGCATATGAGAAATTCTCAAGCAAACACGTTTCTGGAGAAAATGTAGATTGTTATAG
GGTTATAACGAACTCAGATGGACCACTAATTTTAGTTTGTACAGTCGTAGGTCGTTTTAG
GCCTATATACAGCATATATACAGGAAATGGCCTGGTCAAAAAGACAAGTTCGTTATATCTG
TCAATTCGCCATAAGCGTGTTCGTTATATACGTAATTTACTGAAGTAGTGAGTGAGTGA GT
TGGGTTTGACGCCGCTTTGAACAGTATTCCAGTTATATCATATATATGATTCCTGAACGTAG
ATGGGGAAACAACACCATTTCATATTTGTACATTACGTAATCTAGAGGCCATTGTTTTGTTTTT
1161 AGT GGT ATG GTC TGT GGT AAC GGC TGG ACG TGT GAG CAC CGA TGG CGC CAG ATG
382 G M V C G N G W T C E H R W R Q M
1213 TAC AAC ATG GTT GCC TTC AGG AAC ATA GCG GGT TAC TCC GGG TTA TCAA
399 Y N M V A F R N I A G Y S G L S
    
```

图 3 α-淀粉酶基因 DNA 扩增产物的序列分析

Fig.3 Sequence analysis of DNA amplification products of α-amylase gene
 序列两端阴影部分为外显子序列, 中间部分为发现的α-淀粉酶基因内含子序列
 The gray part of the sequence is exon. The white part is intron that was discovered

表 2 4 种多糖裂解酶基因在皱纹盘鲍不同组织中的相对表达量

Tab.2 The expression of four polysaccharide lyase genes of *Haliotis discus hannai* Ino in different tissues

基因	基因相对表达量($\times 10^{-5}$)				
	鳃	足部肌肉组织	触手	外套膜	消化腺
褐藻酸酶(Hdaly)	0.80±0.19 ^a	47.11±10.53 ^a	10.52±8.55 ^{ab}	41.94±17.25 ^a	244426.39±34981.90 ^a
海带淀粉酶(Hdlam)	0.14±0.03 ^b	43.63±6.39 ^a	3.43±0.93 ^b	28.21±6.31 ^a	2280.38±151.56 ^c
α-淀粉酶(Hdamyl)	0.77±0.40 ^a	45.11±5.73 ^a	24.31±15.97 ^a	37.06±16.91 ^a	4399.16±365.63 ^c
纤维素酶(Hdcel)	0.39±0.18 ^{ab}	40.87±6.19 ^a	7.66±1.71 ^{ab}	36.58±21.25 ^a	69872.92±6156.43 ^b

注: 表中值为平均值±标准误($n = 3$); 同一列中不同字母表示差异极显著($P < 0.01$)

3 讨论

自然状态下, 褐藻、红藻和绿藻都是鲍的常见食

物, 但混合投喂实验表明皱纹盘鲍成体优先选择褐藻^[20]。褐藻酸是褐藻特有的重要多糖组分。我国生产上用于喂养皱纹盘鲍的最常用藻类是海带, 且青

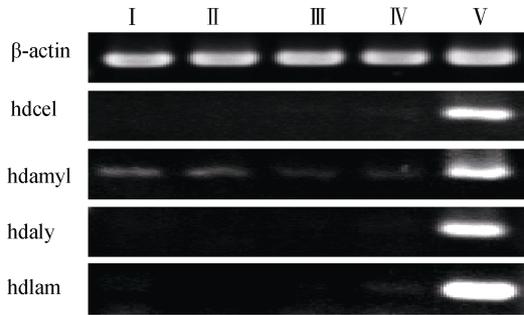


图4 皱纹盘鲍不同组织中4种多糖裂解酶基因的相对表达量

Fig.4 Four kinds of polysaccharide lyase gene expression tested by Semi-quantitative PCR

I~V分别为鳃、足部肌肉组织、触手、外套膜和消化腺

I: gill, II: muscle, III: antenna, IV: pallium, V: digestive gland

岛、大连地区收获的海带褐藻酸含量最高可达干品的约30%^[21]。与淀粉、纤维素等多糖不同,褐藻酸由古罗糖醛酸和甘露糖醛酸2种单糖组成,而非葡萄糖。褐藻酸中的 α -L-古罗糖醛酸(M)和 β -D-甘露糖醛酸(G)各自或相互交替或无规则地通过1,4糖苷键或少量的1,5糖苷键连接成长链状的多糖分子^[21]。本研究定量分析的皱纹盘鲍褐藻酸酶是 α -1,4-聚古罗糖醛酸裂解酶,该酶只水解褐藻酸大分子中相邻L-古罗糖醛酸(M-M)间的 α -1,4糖苷键,因此,该酶的mRNA表达量可部分反映供试皱纹盘鲍对褐藻酸的消化利用情况。

实时定量PCR是定量研究基因表达的一种有效方法。本研究在转录水平对4种多糖裂解酶基因在皱纹盘鲍“97”选育群体第4代成体不同组织间的表达特征进行了定量分析,同时测定了PCR扩增产物的序列。本研究结果表明,皱纹盘鲍“97”群体选育第4代2龄成体消化腺中表达最强的是褐藻酸酶基因,其次为纤维素酶基因,相比之下, α -淀粉酶和海带淀粉酶基因的表达量则低很多。2龄成体褐藻酸酶基因的相对表达量达到了 α -淀粉酶和海带淀粉酶的50倍以上(表2),而此前已有研究报道摄食海带的1龄幼鲍消化腺提取物对褐藻酸的水解活性高于对淀粉的水解活性^[6]。综合上述结果可见,在皱纹盘鲍消化腺中不仅褐藻酸酶mRNA表达量显著高于纤维素酶与淀粉酶(表2),而且褐藻酸酶的活力水平也显著高于淀粉酶^[6]。据此推测成体皱纹盘鲍对褐藻酸的利用可能高于纤维素、淀粉等其他多糖。然而,皱纹盘鲍喜食海带等褐藻与其消化腺中褐藻酸酶基因的高表达是否相关,值得进一步研究。

本文的结果为进一步开展皱纹盘鲍“97”选育群体在不同发育期、摄食不同藻类及不同培育环境下的多糖水解酶基因表达研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 赵洪恩. 鲍的增养殖[M]. 第一版. 沈阳: 沈阳出版社, 1999: 1-25.
- [2] 聂宗庆, 王素平, 燕敬平, 等. 鲍科学养殖百问百答[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 19-28.
- [3] Clark A G, Jowett D A. Hydrolytic enzymes of the paua *Haliotis iris*, a marine gastropod (Note) [J]. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 1978, 12(2): 221-222.
- [4] 王运吉, 刘金珍, 孙勉英, 等. 鲍鱼酶的制备及其性质[J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17(4): 302-304.
- [5] 李太武, 丁明进. 皱纹盘鲍消化酶的研究[J]. 水产科学, 1995, 15(5): 3-7.
- [6] 杨蕙萍, 童圣英. 皱纹盘鲍淀粉酶和褐藻酸酶的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(40): 345-351.
- [7] 康平, 汪秋宽, 宋琳琳, 等. 皱纹盘鲍内脏酶的酶学性质及褐藻胶裂解酶的分离纯化[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 15-22.
- [8] 吴永沛, 何碧烟. 九孔鲍褐藻酸酶、琼脂酶及纤维素酶的提取纯化[J]. 海洋科学, 2002, 26(3): 4-7.
- [9] 吴永沛, 蔡慧农. 金属离子和pH值对九孔鲍几种消化酶活力的影响[J]. 海洋科学, 2003, 27(5): 66-69.
- [10] 黄勃, 王林桂, 李二超. 杂色鲍与九孔鲍消化酶活力的比较[J]. 水产学报, 2003, 27(2): 119-123.
- [11] Shimizu E, Ojima T, Nishita K. cDNA cloning of an alginate lyase from abalone, *Haliotis discus hannai* [J]. Carbohydr Res, 2003, 338(24): 2841-2852.
- [12] Kumagai Y, Ojima T. Enzymatic properties and the primary structure of a β -1, 3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone[J]. Comp Biochem Physiol Part B, 2009, 154(1): 113-120.
- [13] Suzuki K, Ojima T, Nishita K. Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai* [J]. Eur J Biochem, 2003, 270(4): 771-778.
- [14] Nikapitiya C, Oh C, Whang I, et al. Molecular characterization, gene expression analysis and biochemical properties of α -amylase from the disk abalone, *Haliotis discus discus* [J]. Comp Biochem

- Physio Part B, 2009, 152(3): 271-281.
- [15] Nikapitiya C, Oh C, Zoysa M D, et al. Characterization of beta-1, 4-endoglucanase as a polysaccharide-degrading digestive enzyme from disk abalone, *Haliotis discus discus* [J]. *Aquacult Int*, 2010, 18(6): 1061-1078.
- [16] 何庆国. 皱纹盘鲍 4 种多糖裂解酶基因的表达研究 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所硕士学位论文, 2011.
- [17] 李加琦. 皱纹盘鲍配套杂交体系的建立、评价及应用 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2011.
- [18] Li J Q, He Q G, Sun H, Liu X. Acclimation-dependent expression of heat shock protein 70 in Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Ino) and its acute response to thermal exposure[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2012, 30(1): 146-151.
- [19] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. *生物技术通讯*, 2009, 4: 598-600.
- [20] 聂宗庆, 燕敬平. 皱纹盘鲍成体摄食习性的初步研究 [J]. *水产学报*, 1985, 9(1): 19-27.
- [21] 纪明侯. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 208-255.

Expression of polysaccharidase enzymes in the F₄ adults of a mass selected Pacific abalone strain

HE Qing-guo^{1, 2}, WANG Shao-wen^{1, 2}, LI Jia-qi^{1, 2}, LIU Xiao¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: May, 5, 2015

Key words: *Haliotis discus hannai* Ino; alginate lyase; amylase; cellulase; mRNA expression

Abstract: Alginatelyase, laminarinase, α -amylase and cellulase gene segments were amplified in DNA and cDNA templates from the 2-year-old F₄ adults of '97 selected Pacific abalone strain with primers designed based on published cDNA sequences of these genes. Sequencing of these gene segments revealed one intron of 438 bp in the α -amylase gene, one intron of 667 bp in the cellulase gene, and two SNPS in both exon and intron of the cellulase. Semi-quantitative RT-PCR and Real-time PCR analyses showed that the four enzymes were mainly expressed in the digestive gland, with the alginatelyase gene expression the highest, followed by the cellulase gene, suggesting that alginate may be one of the most important carbohydrate sources in the selected abalone strain fed with kelp. The results in this study may form the basis for further studies on the expression of polysaccharidases of the '97 strain at different developmental stages, fed with different macroalgae and under different aquatic environments.

(本文编辑: 梁德海)