

抑制性消减杂交技术结合 cDNA MICROARRAY 技术在中国明对虾 WSSV 感染后差异表达 基因研究上的应用*

王 兵¹ 桂 朗^{1,2} 李富花¹ 相建海¹

(1. 中国科学院海洋研究所 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 以中国明对虾 WSSV 感染 6h 的头胸部组织为实验材料, 提取总 RNA 分别进行正反向抑制性 PCR cDNA 消减杂交, 消减杂交后的 PCR 产物经纯化并克隆到 T 载体, 进而转化成正反向消减文库。消减文库库容分别为: 正向库, 3.7×10^4 ; 反向库, 1.2×10^4 。利用消减文库的克隆构建了 cDNA 表达谱芯片, 共有 1536 个靶点, 其中正、反向文库各 768 个。使用该 cDNA 芯片对 WSSV 感染后 6h 的对虾组织进行了表达谱分析, 对其中 80 个出现明显表达调控变化的阳性克隆进行了测序。结果显示, 在 WSSV 感染后 6h, 病毒基因开始大量表达, 而宿主糖酵解, 嘌呤、嘧啶代谢以及精氨酸代谢等代谢途径的关键基因出现明显下调。这表明病毒已在宿主体内大批量复制并开始抑制宿主代谢。病毒上调表达的 WSV482 可能与病毒毒力的增强有关, 而宿主蛋白的管家基因如 Actin, EF 的下调表达提示: 在利用基因表达技术研究 WSSV 病毒的实验中, 管家基因的选择要十分慎重。此外, 根据作者已有的研究结果, TPI 基因是比较好的候选管家基因。而 WSV414、WSV215 和 WSV482 是对 WSSV 进行 RNA 干涉实验较好的候选靶标基因。

关键词 中国明对虾, 消减文库, 基因芯片

中图分类号 Q789

中国明对虾是我国几大土著海水养殖种类之一, 其养殖产业近几年来饱受病害困扰。在诸多病原当中, WSSV 病毒性虾病是当前最为肆虐的对虾疾病 (Lightner, 1996; Yang *et al.*, 2001), 已经给我国乃至全球的对虾养殖造成了极大危害, 仅我国每年因此病造成的损失就达数千万元 (相建海, 2001)。目前的养殖产业当中以抗病力较强的南美白对虾为主, 约占中国海水虾类总产量的 70%, 而作为我国土著养殖种类, 中国明对虾的养殖产量目前还不到总产量的 10% (王广军, 2007), 前景十分堪忧。中国明对虾由于其独特的氨基酸组成, 肉味非常鲜美, 一直是广大消费者喜爱的海产品之一 (薛长湖等, 1991)。因此,

如何控制其养殖产业中 WSSV 病毒的危害是当前一个重要研究课题, 其研究结果也可以用于其他对虾种类。

虽然中国明对虾免疫机制的研究在近年来已经取得了突破性的进展, 发现了包括多种模式识别蛋白 (Cheng *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Arts *et al.*, 2007)、抗菌肽 (Destoumieux *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005)、酚氧化酶系统 (Liu *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006) 及蛋白酶抑制剂 (Jarasrassamee *et al.*, 2005) 在内的多种免疫效应分子, 但人们对中国明对虾与 WSSV 相互作用的基因还是知之不多。

差异显示技术使人们对生物体在不同生理、病理

* 国家自然科学基金资助项目, 30771639 号; 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目资助, 2007AA09Z430 号、2006AA09Z424 号、2006AA10A403 号。王 兵, 博士, E-mail: wangbing@ms.qdio.ac.cn

通讯作者: 相建海, 研究员, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn; 李富花, 研究员, E-mail: fhli@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2007-07-15, 收修改稿日期: 2007-09-30

条件下的基因表达提供了有力手段,特别是在推出了抑制性 PCR 消减杂交方法后(Diatchenko *et al.*, 1996; Gurskaya *et al.*, 1996), 由于结合了抑制性 PCR 和差异表达基因克隆技术的优点, 该技术已经在肿瘤病理学(Chen *et al.*, 2001; 艾军魁等, 2003)、发育生物学(陈蓉芳等, 2003)等多个研究领域取得了成功。为了研究 WSSV 感染状态下中国明对虾基因表达变化, 构建了 WSSV 感染后 6h 的中国明对虾正向和反向 cDNA 消减文库, 并利用基因芯片技术对消减文库中的克隆进行了表达谱分析, 对其中表达差异显著的消减文库克隆进行了测序和生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用虾为在中国科学院海洋研究所水族楼孵化并养殖至体长 10cm 左右的成体中国明对虾。病虾材料采自青岛上马对虾养殖场的发病中国明对虾, 体长 6—8cm。对照组、实验组对虾均经过 WSSV 病毒特异性 PCR 检测。消减文库构建试剂盒为 Clontech PCR-select TM cDNA 消减杂交试剂盒。实验所用酶类及化学剂均为 Ameraco、Promega、TaKaRa、Merk 等公司 Ultra Pure 试剂及国产优级纯试剂。T 载体为 Promega 公司 T 载体, 受体菌为 DH5 α 。

1.2 感染实验

1.2.1 WSSV 病毒悬液及对照悬液制备 取感染 WSSV 并已发病的中国明对虾组织 10g(采自上马对虾养殖厂), 按 1 : 1(W/W)比例加入含 2.4%氯化钠的 PBS, 在冰浴中于 10000r/min 匀浆 10s, 匀浆液在 3800g、4 离心 15min, 沉淀加入同体积的 PBS, 按上述方法匀浆和离心 2 次, 三次所得上清合并, 加入蔗糖至 30%浓度, 于 31000g 4 离心 50min, 沉淀用 25ml PBS 悬浮备用 4。用此方法提取的 WSSV 病毒, 有可能存在源于对虾组织的 WSSV 病毒以外的未知因子, 而对实验结果产生影响。为了排除可能存在的未知因子的影响, 取中国对虾正常组织 10g, 按上述程序, 制备对照用正常对虾组织提取物, 得到的沉淀用 25ml PBS 悬浮。

1.2.2 注射感染 取暂养虾 40 尾, 随机分为 2 组, 每组 20 尾, 放养于 0.6m³的水族缸中, 水温、盐度同暂养海水, 控温仪控温, 分别于其腹尾交接处肌肉注射 WSSV 病毒悬液、对照悬液。分别在免疫刺激后的 6h 取样备用, 剪碎并液氮速冻后于-80 超低温冰

箱保存。

1.2.3 WSSV 感染效果的检测 使用 WSSV 特异性引物对已经稀释为 50ng/ μ l 的感染和对照组中国对虾 DNA 样品(感染后 6h)进行 PCR 检测。反应体系如下: H₂O 18.1 μ l; 10 \times Buffer 2.5 μ l; MgCl₂ 1.5 μ l; 10mM dNTP 0.5 μ l; 引物(1 μ g/ μ l)各 0.075 μ l; Taq 聚合酶 0.25 μ l; 模板 2 μ l。振荡混合, 稍事离心后加封 1 滴矿物油。PCR 循环为: 94 2min, (94 30s; 56 30s; 72 1min) \times 30 个循环; 72 5min。反应结束后, 取 8 μ l 反应产物, 使用 1%的琼脂糖凝胶, 1 \times TAE 为电泳缓冲液, 80W 恒定功率电泳至溴酚蓝迁移至距离底部 3cm 左右, 使用凝胶成像系统拍照记录。

1.3 cDNA 抑制性 PCR 消减杂交及消减文库的构建 为获得在中国明对虾在 WSSV 感染后特异表达的基因, 选用 WSSV 注射感染后 6h 组织的 mRNA 进行消减文库构建, 其中正向文库以 WSSV 感染后组织 mRNA 为测试子(Tester), 以对照组相同组织 mRNA 为驱除子(Driver); 而反向文库则与之相反, 以对照组 mRNA 为测试子, 以病毒感染组 mRNA 为驱除子(Driver)。总 RNA 提取参照 RNA 一步分离法进行(Chomczynski *et al.*, 1997), mRNA 纯化使用 Qiagen 公司的 mRNA 纯化试剂盒。cDNA 消减杂交过程按 Clontech 的试剂盒说明书进行。共设置了实验组、对照组、控制组, 基本步骤如下: 取 3.0 μ g mRNA 进行反转录并合成 cDNA 双链, 继而使用 RsaI 进行酶切, 然后给两组 cDNA 连接不同的接头。待进行接头连接效果检测后, 进行两轮杂交, 然后对杂交产物进行两次 PCR 扩增, 获得了经正反向消减杂交并抑制性 PCR 扩增的差异表达 cDNA。

差异表达的 cDNA 抑制性 PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖电泳检测后, 使用 Qiagene 公司的胶回收试剂盒, 对 PCR 扩增产物进行纯化回收, 具体步骤参照试剂盒操作手册。回收产物使用 Promega 公司的 T 载体, 在 16 连接过夜并转化入 DH5 α 受体菌株中, 铺板检测库容。

1.4 cDNA 芯片的构建、探针制备、杂交及数据采集

随机挑选中国明对虾 WSSV 感染后 6h 头胸部组织正反向消减文库克隆共计 1536 个, 其中正、反向文库各 768 个克隆。cDNA 插入片段通过 PCR 获得, PCR 扩增产物经纯化后使用电泳检测扩增物质量。合格的 PCR 产物干燥后溶解于 3 \times SSC 中并点制到 NH₂ 修饰的玻片上, 点制后经 2h 水合(湿度 70%)、0.5h 室温干燥以及紫外交联(65mj/cm)10min (Schena *et al.*,

1995)。再依次经 0.2% SDS、纯水、0.2% NaBH₄ 处理 10min, 干燥后备用。芯片上设 8 个空白(点样缓冲液)和 14 个阴性对照(Rice U2 RNA), 芯片点制在上海博星生物芯片公司完成, 点样机为 Cartesian 7500 Spotting Robotics (Cartesian)。

探针合成采用的是在 cDNA 第一链合成时掺入 Cy3-dCTP(对照组)和 Cy5-dCTP(实验组)的方法来进行荧光标记, 标记后的探针用 Qiagen 核酸纯化试剂盒进行纯化。杂交实验使用的是博星公司芯片杂交试剂盒, 实验方法参照操作手册。为校正实验误差, 设置平行实验一次。荧光信号的扫描使用的是 ScanArray 4000 scanner (General Scanning), 图像分析处理软件为 ImaGene 3.0。使用 SPSSv11 软件 (www.spss.com) 进行统计分析, 使用 origin 软件 (http://www.originlab.com/) 进行数据图像绘制。

基因差异表达的标准为: 均一化系数(R)在 0.4—2.5 之间、信号前景值 3 倍于背景值以上、Cy3 和 Cy5 信号值其中之一必须大于 800 或两者皆大于 200; 将 Cy3 均一化为 $Cy3^*$ ($Cy3^* = Cy3 \times R$), 取 $Cy5/Cy3^*$ 的自然对数绝对值 2.0(上调)或 0.5(下调)的基因进行进一步分析。

2 结果与讨论

在对 WSSV 检测中, 作者采用的是一步法 PCR 检测, 该方法相对嵌套式 PCR 可能灵敏度要低一些, 但对于差异显示实验来说, 该灵敏度已经足够。实验中采用抑制性 PCR 消减杂交的方法, 具有模板用量少、杂交次数少、时间短(2—3d)、不需要人工分离双链和单链 cDNA 等一系列的优势(Duguid *et al*, 1990)。在作者的实验中, 采用了国际上常见的消减文库和基因芯片技术结合的方法, 对消减文库获得的大量

差异表达基因进行了高通量的筛选。对筛选出的阳性克隆进行测序和生物信息学分析后发现, 在所点制的 1536 个克隆中, 有 674 个是发生了显著变化, 占所点制克隆总数的 44%, 这说明在 WSSV 感染状态下, 正常组织和患病组织中都包含有大量差异表达的基因。

已知的 95% 下调基因源自宿主, 其基因克隆大多来自于反向消减文库。根据反向消减文库的构建原理(Hara *et al*, 1991), 在反向消减文库中获得的是 6h 未感染对虾中高丰度或是特异性表达的基因。因此在 6h 感染的组织当中, 这些基因出现明显下调趋势是合理的, 这也从侧面证明了消减实验和感染实验是成功的。

2.1 感染实验前后实验材料的 WSSV 检测

用 WSSV 特异性引物扩增产物大小约为 600bp。病虾制备的悬浮液在 600bp 有 WSSV 特异性扩增产物, 而感染前的实验用虾经 PCR 检测未见 WSSV 特异性扩增(图 1A)。感染后的实验用虾经 PCR 检测出现了 WSSV 特异性扩增条带, 而对照组中未见 WSSV 特异性扩增(图 1B), 这表明实验用虾经过感染实验被 WSSV 感染。

2.2 芯片杂交结果及数据分析

在芯片上的阴性和空白对照点均没有杂交信号, 平均信号强度高于背景 3 倍以上, 信号强度均一化系数为 1.23。上述指标说明芯片杂交实验合格。共有 674 个克隆发生了明显的表达变化, 其中上调的有 314 个, 下调的有 360 个。选择其中 80 个上下调明显的克隆, 上下调各 40 个克隆, 进行测序, 测序结果同 NCBI 数据库进行了比对并按其分子功能进行了分类, 结果见表 1。

2.2.1 下调的已知基因 在获得的 46 个已知基因

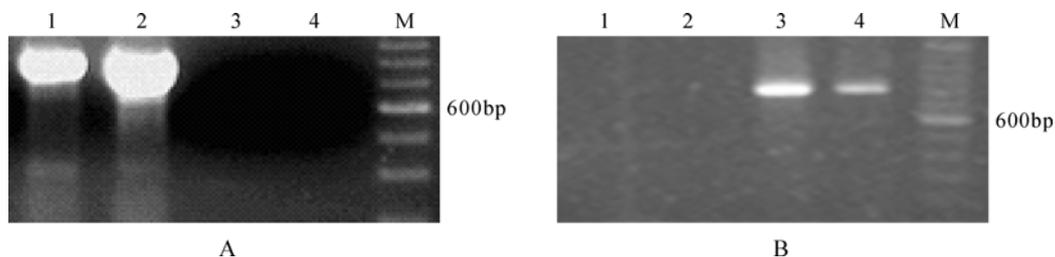


图 1 WSSV 特异性引物 PCR 扩增结果

Fig.1 The result of WSSV-specific DNA amplification

A. 感染实验前, B. 感染实验后。A 中, 1 为使用病虾组织制备的 WSSV 悬浮液, 2 为 WSSV 病毒 DNA 提取物, 3 为感染实验用中国明对虾, 4 为对照实验用正常对虾组织悬浮液。可以看出病虾组织制备的 WSSV 悬浮液中特异性扩增条带与病毒 DNA 扩增条带大小一致, 实验用虾和对照实验用悬浮液均无 WSSV 特异性扩增。B 中, 1、2 为对照组(注射正常对虾组织悬浮液), 3、4 为感染实验组(注射 WSSV 发病对虾组织悬浮液), 可以看出感染实验组对虾确实已经被 WSSV 病毒感染。M 为分子量标准: 100bp ladder

表 1 差异表达基因的功能注释和分类
Tab.1 The differential expression genes: annotation and functional classification

Gene_ID	Ratio1	Ratio2	Definition	E-Value
下调				
宿主管家基因				
R1-5(C8)	0.167	0.341	Aedes aegypti 延伸因子 2	2E-22
R1-4(B1)	0.212	0.269	Aedes aegypti 延伸因子 2	2E-22
R2-3(F12)	0.196	0.230	斑节对虾肌动蛋白 2	1E-82
R2-2(H12)	0.352	0.417	斑节对虾肌动蛋白 2	9E-81
R1-s-2(B5)	0.446	0.226	斑节对虾肌动蛋白 2	2E-66
宿主能量代谢				
R1-1(F1)	0.055	0.114	斑节对虾精氨酸激酶	9E-17
R1-1(C1)	0.058	0.114	斑节对虾精氨酸激酶	9E-17
R1-4(H6)	0.176	0.183	斑节对虾精氨酸激酶	5E-16
R2-s-2(A3)	0.207	0.222	斑节对虾精氨酸激酶	4E-11
R1-3(E2)	0.227	0.418	斑节对虾精氨酸激酶	6E-14
R2-2(H11)	0.262	0.420	斑节对虾精氨酸激酶	3E-45
R1-1(F10)	0.390	0.422	斑节对虾精氨酸激酶	9E-17
R1-3(E9)	0.430	0.359	斑节对虾精氨酸激酶	2E-12
R2-4(H10)	0.210	0.391	ATP 合成酶 亚单位	2E-65
R2-3(C5)	0.054	0.107	斑节对虾磷酸丙酮酸水合酶	4E-45
R2-s-3(B8)	0.337	0.304	斑节对虾磷酸丙酮酸水合酶	4E-45
R2-5(D6)	0.387	0.210	斑节对虾磷酸丙酮酸水合酶	4E-45
宿主嘌呤、嘧啶代谢				
R2-1(F9)	0.231	0.500	核苷二磷酸激酶(NDPK)	4E-45
R1-1(E1)	0.194	0.319	凡纳滨对虾血蓝蛋白	4E-20
上调				
WSSV 病毒 DNA 结合蛋白				
F-3(D12)	3.671	20.507	WSV215, DNA 结合蛋白	2E-38
F-s-1(A11)	6.839	23.219	WSV482	5E-11
F-5(B1)	78.212	83.510	WSV482	1E-22
F-2(B4)	4.697	9.409	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-s-3(E3)	5.688	13.452	WSV215, DNA 结合蛋白	2E-32
F-5(C6)	8.365	23.520	WSV215, DNA 结合蛋白	1E-38
F-5(H4)	11.648	72.779	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-s-2(G3)	16.341	40.233	WSV215, DNA 结合蛋白	2E-38
F-s-1(B3)	19.148	82.933	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-4(F12)	25.850	88.045	WSV215, DNA 结合蛋白	2E-38
F-4(B6)	31.385	159.029	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-4(B8)	35.501	153.055	WSV215, DNA 结合蛋白	4E-45
F-1(C6)	49.859	105.494	WSV215, DNA 结合蛋白	1E-24
F-s-2(C3)	56.029	98.734	WSV215, DNA 结合蛋白	1E-41
F-4(G7)	59.285	107.720	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-1(A3)	122.308	146.705	WSV215, DNA 结合蛋白	7E-39
F-2(G11)	147.945	98.625	WSV215, DNA 结合蛋白	6E-39
F-1(D1)	154.865	157.955	WSV215, DNA 结合蛋白	5E-34
F-3(B11)	157.825	165.300	WSV215, DNA 结合蛋白	9E-38
F-1(E9)	326.980	258.950	WSV215, DNA 结合蛋白	3E-35
F-2(H4)	6.726	41.130	WSV414, VP19	4E-40
F-s-1(F5)	8.138	49.557	WSV414, VP19	7E-31
F-s-1(F11)	9.742	34.847	WSV414, VP19	8E-43
F-3(F4)	14.272	69.395	WSV414, VP19	8E-32
F-3(F5)	23.403	68.483	WSV414, VP19	2E-42
F-s-2(C12)	3.420	33.013	WSV482	2E-28
宿主微管结构蛋白				
F-3(G1)	8.758	10.353	微管蛋白 1 链	1E-7

注：右侧数据表示基因相似性常用的科学计数法，例如“1E-7”表示 1×10^{-7}

片段中, 有 20 个来源于宿主, 其中 95%(19/20)宿主来源的基因出现了下调(表 1), 这 19 个已知基因片段根据其功能分类为管家基因、能量代谢途径、嘌呤代谢途径以及对虾血液结构蛋白血蓝蛋白。

管家基因 管家基因 Actin 和 EF 的表达在病毒侵染组织中出现了显著变化, 这一现象非常值得注意。因为管家基因是基因表达实验中非常关键的影响参数(Thellin *et al*, 1999), 在 WSSV 病毒实验中, 正确的选择管家基因进行定量 PCR 实验非常重要。根据已有的研究结果, 18s 和 TPI 基因均为对虾 WSSV 实验较好的候选管家基因(Wang *et al*, 2006; Dhar *et al*, 2004)。

能量代谢相关基因 在芯片实验中, 有三个与能量代谢相关的基因发生了明显的下调, 包括精氨酸激酶、磷酸丙酮酸水合酶和 ATP 合成酶, 这些基因片段占了下调已知基因片段的 63%(12/19)。精氨酸激酶广泛存在于无脊椎动物体内, 是一种与细胞的能量代谢、肌肉收缩、ATP 的再生等有直接关系的重要激酶, 可以催化 ATP 与精氨酸之间磷酸基团的可逆性交换, 生成 ADP 和磷酸精氨酸(郭淑元等, 2004)。精氨酸激酶基因的表达量与组织细胞的代谢活性密切相关(van Hulten *et al*, 2000), 代谢活跃的组织对能量贮藏与利用的调节水平要求较高, 精氨酸激酶表达量则较高。而 ATP 合成酶则是生物体主要的能量供应酶, 用于产生 ATP (Junge, 1999)。磷酸丙酮酸水合酶则是糖酵解过程中的一个关键酶, 它的减少也最终导致了 ATP 的产量降低。这些基因的下调显然会对生物体能量代谢产生重大影响。此次从反向消减文库中获得的精氨酸激酶和其基因芯片检测结果都表明了 WSSV 感染 6h, 精氨酸激酶的表达下调。但在 WSSV 感染后精氨酸激酶的表达变化也有相反的研究结果(Wang *et al*, 2006; Astrofsky *et al*, 2002), 这可能与取样时间、管家基因的不同选择有关。

2.2.2 上调的已知基因 在上调的基因中, 只有一条是宿主的基因, 其他均为 WSSV 所表达的基因。分述如下:

病毒基因 在上调的 27 个克隆中, 有 18 个是 WSV215(VP15), 5 个 WSV414(VP19), 还有 2 个是 WSV482。目前对 VP15 和 VP19 的研究较多, 已经证明了上述基因是 WSSV 病毒的重要结构蛋白(van Hulten *et al*, 2000, 2002)。VP19 通过两个跨膜结构域锚定于病毒囊膜, 是 WSSV 两种主要囊膜蛋白之一

(另一种是 VP28)(易志刚等, 2004)。病毒囊膜在感染过程中起关键作用, 通过原核载体表达重组 VP19, 注射和投喂螯虾, 可以使得螯虾抗 WSSV 病毒的能力增强(贾启军等, 2006)。利用家蚕蛹表达的 Vp19 与 Vp28 合并口服, 能诱导螯虾产生显著的免疫保护作用(魏克强等, 2006)。这都证实了 WSSV 的囊膜蛋白 VP19 可被螯虾免疫系统识别, 实现免疫保护。其原因可能是 VP19 诱导虾体分泌具有中和作用的物质, 从而阻止病毒的入侵或者是阻断侵入病毒的扩散(Witteveldt *et al*, 2004)。囊膜蛋白 VP19 可能介导了 WSSV 的吸附和侵入宿主过程, 但目前还未见报道其与 WSSV 的感染直接有关。而 VP15 则位于衣壳蛋白上(van Hulten *et al*, 2001), 人们推测其为结合 DNA 的类组蛋白, 功能是参与 WSSV 染色体的凝聚和包装入核衣壳过程, 但现有研究还不能确定其是否与 DNA 直接结合(Witteveldt *et al*, 2005)。感染 WSSV 的中国明对虾, 在感染 6h 左右上述基因的高丰度表达, 可能说明 WSSV 病毒已在宿主体内完成复制周期。大量表达的衣壳结构蛋白 VP15 装配核衣壳, 结合复制的病毒 DNA, 是病毒成熟的基础。病毒基本结构装配完全后, 大量表达的囊膜蛋白 VP19 为病毒出芽的过程包装囊膜做准备。根据 Yang 等(2001)的报道, WSV482 是具有跨膜蛋白结构域的一个 ORF, WSV482 和目前已知物种基因相似性很小, 目前的研究发现, WSV482 的 ORF 位于 WSSV 病毒不稳定区域, 自然变异使其在不同年份的病毒株中存在很大差异(吴常嵩等, 2006)。WSV482 大片段基因组的缺失有可能导致 WSSV 病毒毒力减弱(Lan *et al*, 2002), 上调表达的 WSV482 在病毒的复制过程中也可能相应的病理作用, 但目前的研究还很不充分, 其功能还需进一步探讨。

宿主基因 在消减文库的宿主基因中, 只有微管蛋白发生了上调表达。在对 RNA 病毒的研究中发现, 宿主的某些结构蛋白, 如 Actin 或 Tubulin, 可能参与了 RNA 病毒的转录(Ogino *et al*, 2003)。目前尚无 Tubulin 在 DNA 病毒感染中起作用的研究报导。但作者的研究表明, 在 WSSV 侵染后, 对虾 Tubulin 发生了强烈的上调表达。Tubulin 在 WSSV 侵染中的作用值得深入研究。

3 结语

消减文库的建立为作者进一步的研究工作将带来极大的方便。通过消减文库, 显示宿主中有氧和无

氧能量代谢相关基因,精氨酸激酶、磷酸丙酮酸水合酶和 ATP 合成酶在病毒感染后均出现下调表达,可能是由于病毒干扰宿主能量代谢等生化反应过程,抑制相关基因表达,刺激宿主条件有利于自身复制。而唯一上调表达的 Tubulin 蛋白可能参与协同病毒感染,利于 WSSV 侵染宿主。而在侵染后 6h,病毒蛋白 VP19(WSV215)、VP15(WSV414)和 WSV482 均已出现大幅度上调表达。目前已知前两种蛋白是 WSSV 的囊膜蛋白,而对 WSV482 的研究还很不充分,仅知其缺失会造成病毒毒力下降。因此作者推断病毒在感染宿主 6h 即处于复制活跃阶段,而 WSV482 在此过程中可能起到了重要作用。针对上述现象,如果使用 WSV414、WSV215 和 WSV482 开放阅读框来进行 RNA 干涉实验,很可能可以起到对该病毒良好的抑制效果。

参 考 文 献

- 王广军, 2007. 亚洲的海水虾类. 水产科技, 3: 36—38
- 艾军魁, 张志文, 辛殿祺等, 2003. 抑制消减杂交结合 cDNA 微阵列技术鉴定人肾癌组织高表达基因谱. 中国科学(C 辑), 33: 436—445
- 吴常嵩, 杨 丰, 2006. 不同年份对虾白斑综合征病毒基因组差异的微阵列分析. 高技术通讯, 16(2): 201—203
- 陈蓉芳, 张天宝, 印木泉等, 2003. 小鼠短指 / 缺指畸形肢体 cDNA 消减文库的构建. 中国药理学与毒理学杂志, 17: 281—286
- 易志刚, 黄 健, 李 筠, 2004. WSSV 结构、功能及基因组学研究概况. 海洋水产研究, 25(1): 79—85
- 相建海, 2001. 海水养殖生物病害发生与控制. 北京: 海洋出版社, 104—154
- 贾启军, 孟小林, 徐进平等, 2006. 对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 VP19 的融合表达及其抗病毒感染作用. 中国病毒学, 21(6): 585—588
- 郭淑元, 叶 盛, 王 政等, 2004. 精氨酸激酶及其底物复合物的结晶和结晶学初步研究. 自然科学进展, 14(12): 1475—1478
- 薛长湖, 孔繁明, 李兆杰等, 1991. 中国对虾风味物质的产生机理. 水产学报, 21: 57—62
- 魏克强, 许梓荣, 2006. 家蚕蛹表达对虾白斑综合症病毒囊膜蛋白 Vp28 和 Vp19 的免疫原性. 中国兽医学报, 26(4): 360—363
- Arts J A, Cornelissen F H, Cijssouw T *et al*, 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol, 23: 504—513
- Astrosky K M, Roux M M, Klimpel K R *et al*, 2002. Isolation of differentially expressed genes from white spot virus (WSV) infected Pacific blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). Arch Virol, 147: 1799—1812
- Chen I, Hsieh T, Thomas T L *et al*, 2001. Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization. Gene, 262: 207—214
- Cheng W, Liu C H, Tsai C H *et al*, 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and beta-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol, 18: 297—310
- Chomczynski P, Sacchi N, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochem, 62: 156—159
- Destoumieux D, Munoz M, Bulet P *et al*, 2000. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). Cell Mol Life Sci, 57: 1260—1271
- Dhar A K, Licon K S, Veazey G D *et al*, 2004. Validation of housekeeping genes for measuring gene expression in white spot syndrome virus (WSSV) infected shrimp by real-time RT-PCR. Plant Animal Genomes XII Conference, January 10—14. Town & Country Convention Center, San Diego, CA CA 92182, USA
- Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P *et al*, 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 93: 6025—6030
- Duguid J R, Dinauer M C, 1990. Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res, 18: 2789—2792
- Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A *et al*, 1996. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. Anal Biochem, 240: 90—97
- Hara E, Kato T, Nakada S *et al*, 1991. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)30-latex and PCR: isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. Nucleic Acids Res, 19: 7097—7104
- Jarasrassamee B, Supungul P, Panyim S *et al*, 2005. A tassanakajon. Recombinant expression and characterization of five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Mar Biotechnol, 7: 46—52
- Junge W, 1999. ATP Synthase and other motor proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 96(9): 4735—4737
- Lan Y, Lu W, Xu X, 2002. Genomic instability of prawn white spot bacilliform virus (WSBV) and its association to virus virulence. Virus Res, 90(1—2): 269—274
- Lightner D V, 1996. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. Rev Sci Tech, 15: 579—601
- Liu C H, Tseng D Y, Lai C Y *et al*, 2006. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase cDNA from haemo-

- cytes of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and its transcription in relation with the moult stage. *Fish Shellfish Immunol*, 21: 60—69
- Liu F, Liu Y, Li F *et al*, 2005. Molecular cloning and expression profile of putative antilipoplysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Mar Biotechnol*, 7: 600—608
- Liu Y C, Li F H, Dong B *et al*, 2007. Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *Mol Immunol*, 44: 598—607
- Lu K Y, Huang Y T, Lee H H *et al*, 2006. Cloning the prophenoloxidase cDNA and monitoring the expression of proPO mRNA in prawns (*Macrobrachium rosenbergii*) stimulated *in vivo* by CpG oligodeoxynucleotides. *Fish Shellfish Immunol*, 20: 274—284
- Ogino T, Iwama M, Ohsawa Y *et al*, 2003. Interaction of cellular tubulin with Sendai virus M protein regulates transcription of viral genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 311(2): 283—293
- Schena M, Shalon D, Davis RW *et al*, 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270(5235): 467—470
- Theillin O, Zorzi W, Lakaye B *et al*, 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75(2—3): 291—295
- van Hulst M C, Goldbach R W, Vlaskovits J M, 2000. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *J Gen Virol*, 81(10): 2525—2529
- van Hulst M C, Reijns M, Vermeesch A M *et al*, 2002. Identification of VP19 and VP15 of white spot syndrome virus (WSSV) and glycosylation status of the WSSV major structural proteins. *J Gen Virol*, 83(1): 257—265
- van Hulst M C, Witteveldt J, Peters S *et al*, 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*, 286(1): 7—22
- Wang B, Li F H, Dong B *et al*, 2006. Discovery of genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fenneropenaeus chinensis* through cDNA microarray. *Marine Biotechnol*, 8(5): 491—500
- Witteveldt J, Cifuentes C C, Vlaskovits J M *et al*, 2004. Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by oral vaccination. *J Virol*, 78(4): 2057—2061
- Witteveldt J, Vermeesch A M G, Langenhof M *et al*, 2005. Nucleocapsid protein VP15 is the basic DNA binding protein of white spot syndrome virus of shrimp. *Arch Virol*, 150: 1121—1133
- Yang F, He J, Lin X *et al*, 2001. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. *J Virol*, 75: 11811—11820

SCREENING OF DIFFERENTIAL EXPRESSION GENES IN WSSV CHALLENGED CHINESE SHRIMP, *FENNEROPENAEUS CHINENSIS* USING SSH AND cDNA MICROARRAY

WANG Bing¹, GUI Lang^{1,2}, LI Fu-Hua¹, XIANG Jian-Hai¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071;

2. Graduate School, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049)

Abstract After challenged with WSSV for 6h, forward and reverse SSH (suppression subtractive hybridization) were performed by mRNA of cephalothorax of Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. The PCR products of SSH were cloned into a T vector, and then transferred into plasmid libraries. The titers of the two libraries were, forward library at 3.7×10^4 , and reverse library at 1.2×10^4 . A total of 1536 randomly-selected cDNA clones of the SSH libraries (768 each) were stained on a glass slide to construct cDNA microarray. The gene expression profiles of cephalothorax of the shrimp 6h after WSSV injection were examined in microarray. Eighty significantly differential expression clones were sequenced. The results reviewed that, 6h after WSSV injection, the WSSV genes were expressed at a high mRNA level while the processes of host glycolysis and metabolism of purine, pyrimidine, and arginine kinase were observably down regulated. The results indicated that the up regulation of WSV482 might result in the virulence of WSSV. The down regulation of house keeping genes includes Actin and Efa reminded us that we should carefully choose the inter-stander in such experiments. Besides, we believe that TPI is a good candidate of inter-stander based on our previously experiments. WSV414, WSV215 and WSV482 can be good candidates of target of RNA interference.

Key words *Fenneropenaeus chinensis*, SSH library, Microarray