

基于抑制消减杂交识别白化刺参和青刺参差异表达基因

朱琳, 郭春阳, 王振, 李成华*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为探寻刺参体色遗传的内在分子基础, 运用 Clontech SSH 试剂盒分别构建了白化刺参和青刺参的正反向抑制性消减杂交文库; 221 个克隆测序分析确认了体色遗传差异性表达基因 26 个; GO 分析显示这些差异基因分别隶属于核糖体基因、能量代谢、细胞结构、免疫调控、白化性状直接相关基因及未知基因. 荧光定量 PCR 结果显示: ADP-核糖激化因子在白化刺参中相对表达量约是青刺参的 2 倍, 而虾青素和小眼畸形转录因子在白化刺参中相对表达量则低于青刺参, 分别为青刺参的 0.38 倍和 0.47 倍, 相对表达量趋势和文库所得结果一致. 该研究为进一步了解刺参体色分化及其优良性状的形成机制提供了基础资料.

关键词: 仿刺参; 体色遗传; 抑制消减杂交; 荧光定量 PCR

中图分类号: Q785

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 01-0008-05

刺参又称仿刺参 (*Apostichopus japonicus*, Selenka), 属棘皮动物门, 海参纲, 楯手目, 刺参科, 仿刺参属, 是我国重要的水产养殖品种^[1]. 刺参主要分布于我国辽宁、山东、河北等省浅海沿岸, 具有补肾、益精、养血之功能, 营养价值极高. 依据其体表颜色的差异, 人们通常把棕色、青色或褐色的刺参称之为青刺参, 体表颜色局部为白色或全部为白色的刺参称之为白化刺参.

白化刺参以其生长快、抗逆性强等优势被认为是优良的刺参品种. 野生刺参白化是一种比较罕见的现象, 其与普通刺参的外观区别主要表现为全身或局部体表呈白色. 已有研究表明白化刺参繁殖的后代仍具有白化特征, 说明刺参白化具有一定的遗传性, 因此从基因层面研究刺参白化, 有利于我们更好地了解刺参白化的机理, 从而更好地对刺参的生长进行人工干预, 增加刺参的品质.

有研究表明, 黑色素细胞或黑色素生成发生障碍是导致白化的直接原因. 目前已经展开对刺参白化在基因层面上研究, 赵鹤凌^[2]比较了虾青素及小眼畸形相关转录因子在白化刺参和普通刺参

中表达的情况, 白化刺参中 2 种基因相对表达量均低于普通刺参. 为识别白化刺参优良性状的分子生物学基础, 笔者构建了白化刺参和青刺参正反消减文库, 筛选了差异表达基因片段, 为刺参分子设计育种提供参考资料.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验样本

白化刺参和青刺参各 20 个个体于 2012 年 3 月采集于辽宁省锦州市某刺参育苗场, 湿重分别为 (95 ± 12) g 和 (85 ± 12) g, 活体低温带回实验室.

1.1.2 主要试剂

实验用 RNAiso Plus, PCR-Select cDNA Subtraction Kit, M-MLV cDNA Synthesis Kit, 单链 cDNA 合成试剂盒(PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit), pMD18-T 载体和 PCR 扩增试剂均购自大连宝生生物公司; PCR 产物回收试剂盒为 QIAGEN 公司产品, DH5 α 感受态细胞由实验室自行制备, 其他试剂均为分析纯.

收稿日期: 2013-04-08.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journal.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省科技厅海水养殖创新团队项目 (2012R10025-09).

第一作者: 朱琳 (1986-), 男, 山东高密人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: zl2783687@126.com

*通信作者: 李成华 (1978-), 男, 山东济宁人, 博士/副研究员, 主要研究方向: 海洋生物技术. E-mail: lichenghua@nbu.edu.cn

1.2 方法

1.2.1 刺参总 RNA 的提取

解剖刺参取其体壁,用 1×PBS 缓冲液短暂清洗后,置于预冷的研钵中加液氮研磨至粉状,按照说明书要求比例加入 RNAiso Plus,装入 1.5 mL 管中存于超低温冰箱中备用。

每管处理样品加入 0.3 mL 氯仿,用力震荡 30 s,室温放置 5 min, 12 000 g, 4℃, 离心 15 min; 离心后将上层水相移至 1.5 mL 管中,加入等体积异丙醇,室温放置 15 min, 12 000 g, 4℃, 离心 10 min, 沉淀 RNA; 加 1 mL 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀, 12 000 g, 4℃, 离心 5 min, 弃上清。然后用 20 μL RNase-Free 水溶解,经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整程度,微量分光光度计检测其浓度。

1.2.2 抑制消减文库的构建

约 5 μg 刺参 Total RNA 用于抑制消减文库构建,具体实验操作参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 和 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 说明书进行。正向消减文库(FSL)是以白化刺参为 tester,青刺参为 driver,反向消减文库(RSL)是以青刺参为 tester,白化刺参为 driver。

用 PCR 产物回收试剂盒纯化第 2 次 PCR 产物,将其连接到 PMD18-T 载体中,并转化到 DH5α 感受态细胞中,将转化后的细胞涂布到含氨苄霉素的 LB 平板中过夜培养,挑取单菌落用 M13 引物检测插入到载体中核酸片段大小,大于 200 bp 的送 Invitrogen 公司测序。

1.2.3 测序分析

测序结果经过载体去除后,借助 NCBI 的 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行比对分析;相应的编码蛋白序列用 Expert Protein Analysis System (<http://www.expasy.org/>) 进行分析。

1.2.4 文库结果验证

取 6 个白化刺参和 6 个青刺参体壁分别提取 RNA,根据单链 cDNA 合成试剂盒说明书要求转录成单链 cDNA,所得 cDNA 作为验证的模板。从消减文库得到的基因中,根据得到的 ADP-核糖激化因子、虾青素以及小眼畸形转录因子 3 种基因的部分基因片段设计定量引物(表 1)。以核糖体 18S rRNA 基因为内参基因,研究这 3 种基因在白化刺参和青刺参体壁中的相对表达。

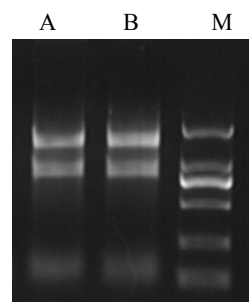
表 1 实验用引物信息表

引物名称	序列(5'—3')
ADP-F	AACGAATCTAAAATCATTAGTCAGTG
ADP-R	CTACTATTGCTTGGAAAACGAGA
Astacin F	AGTTGCCCTTCTTGGTCTT
Astacin R	CTCGGAATCCATCTTACA
Mitf F	CCTTACTGCGTCTTCTGC
Mitf R	GTTCTGCTTGATGGTCG
18S F	CGAGTCGTGGGAGATTTT
18S R	CACTTTGGCTGCTTTGAAC

2 结果

2.1 刺参总 RNA 分析

刺参总 RNA 的分析结果如图 1 所示。28S rRNA 和 18S rRNA 条带明显,均没有明显的拖尾,且两者的亮度比例在 1.5~2.0 范围内,说明提取的 RNA 质量良好,达到建库要求。

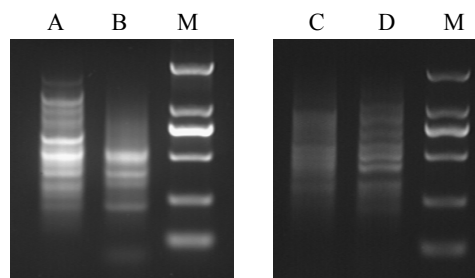


A 为白化刺参; B 为正常刺参; M 为 Marker 2000

图 1 刺参体壁总 RNA 电泳图谱

2.2 抑制消减文库的构建

抑制性消减文库构建参照实验指导进行,二次杂交后 PCR 产物如图 2 所示。文库 cDNA 大小在 200~1 000 bp,未消减的对照组条带亮度明显高于消减过的实验组,条带长度范围也大于实验组。挑菌落 PCR 分析表明插入片段在 100~600 bp 之间(图 3)。



A, B 为正向杂交对照和实验组; C, D 为反向杂交对照和实验组

图 2 二次 PCR 分析杂交样品和未杂交样品

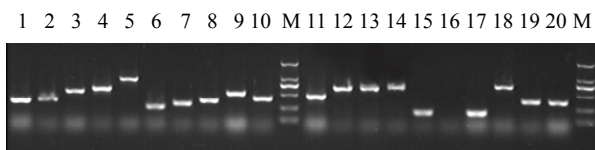


图3 PCR 检测杂交片段长度

2.3 测序分析

共挑取了243个克隆测序,221个测序成功,去载体后经BLAST比对分析,81.5%序列与已知的基因没有匹配或相似度较低,有41(18.5%)个克隆测序结果比对后能与已知基因匹配,见表2和表3,涉及到核糖体基因(核糖体蛋白L3)、能量代谢

(ATP合酶、NADH脱氢酶I、ADP-核糖激化因子)、细胞结构(β -肌动蛋白、水解酶)、免疫(铁蛋白)、白化性状直接相关基因(虾青素、小眼畸形相关转录因子、酪氨酸激酶)及其他基因。

2.4 文库结果验证

定量结果由Rotor-Gene自带软件,采用Comparative Delta-delta Ct法分析,结果如图4所示。从图4可知,ADP-核糖激化因子在白化刺参中相对表达量约是青刺参的2倍,而虾青素和小眼畸形转录因子在白化刺参中相对表达量均低于青刺参,分别是2.6和2.1倍,结果和文库结果相符。

表2 正向消减文库筛选的差异表达基因

克隆序号	克隆名称	数据库编号	物种	匹配率/%	冗余数
F2	核糖体蛋白 L3	NP_001120075.1	亚马逊松鼠猴	86	1
F4	羟基脂肪酸合成酶	YP_005027864.1	<i>Dechlorosoma suillum</i>	36	2
F5	ATP 合酶	YP_002836158.1	刺参	90	3
F8	推测蛋白	XP_001636618.1	海葵	55	1
F10	铁蛋白	AAY89589.1	刺参	99	3
F23	NADH 脱氢酶 I, H 副族 t	ZP_06715481.1	迟缓爱德华菌	47	1
F26	细胞色素 c 氧化酶 III	YP_002836159.1	刺参	92	1
F37	推测蛋白	CCA30004.1	新孢子虫利物浦	40	1
F43	推测蛋白	XP_002606260.1	文昌鱼	57	1
F47	微卫星序列	FJ863078.1	刺参	98	1
F48	推测蛋白	XP_002996717.1	东方蜜蜂微孢子虫	42	1
F51	s-腺苷高半胱氨酸水解酶	ADH43555.1	庞贝糯虫	86	3
F52	ADP-核糖激化因子	XP_002260453.1	诺氏疟原虫	93	2
F55	CRISPR-相关 RAMP 蛋白	YP_003615800.1	<i>Methanocaldococcus infernus</i>	40	1

表3 反向消减文库筛选的差异表达基因

克隆序号	克隆名称	数据库编号	物种	匹配率/%	冗余数
R21	核糖体蛋白 L27a	XP_002735002.1	囊舌虫	93	1
R34	虾青素	HQ655812.1	刺参	97	4
R35	推测蛋白	XP_777256.1	新型隐球菌	45	1
R37	酪蛋白激酶 I, delta	XP_002167634.1	大乳头水螅	29	1
R41	小眼畸形转录因子	HQ606465.1	刺参	87	2
R45	APC 家族氨基酸聚胺-有机转运体	YP_001485465.1	短小芽孢杆菌	45	1
R52	185 kDa 丝蛋白	AAA99803.1	摇蚊	41	2
R56	钙粘素-5	XP_003417144.1	非洲象	42	1
R61	带有免疫球蛋白 v 结构域的新蛋白	CAX13578.1	斑马鱼	28	1
R63	假设蛋白 SPW_4421	ZP_09404117.1	链霉菌	33	1
R76	细胞壁相关水解酶	CCB82302.1	戊糖乳杆菌	49	1
R84	β -肌动蛋白	EU668024.1	刺参	99	3

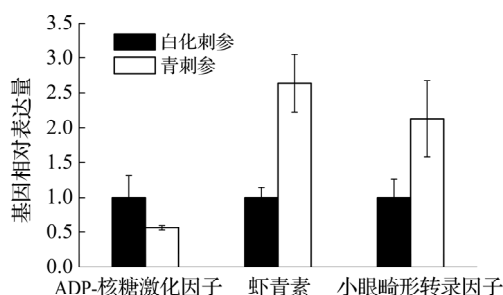


图4 白化刺参和青刺参表达的定量PCR分析

3 讨论

抑制消减杂交技术(SSH)是一种筛选差异性表达基因的有效方法,目前已成功用于筛选虾^[3-5]、蛤蜊^[6]、鱼^[7]、刺参^[8]差异性表达基因。本研究成功构建了不同体色刺参的正反向消减文库,筛选出差异表达基因26个,其中虾青素、小眼畸形相关转录因子和酪蛋白激酶在白化刺参的相对表达量低于普通刺参。虾青素是海洋甲壳类动物和鱼类体内色素中主要的类胡萝卜素,在水产品饵料中添加适量的虾青素可改善其皮肤和肌肉的颜色^[9-10],目前研究已证实其在发育至39d后的白化刺参体壁中表达量显著低于普通刺参^[11],因此我们推断虾青素参与刺参体色的调控,其表达与刺参色素的形成有一定相关性。由于黑色素沉积的缺乏是导致动物白化特征发生的直接原因,因此研究与黑色素合成、分泌及代谢相关的基因是研究白化现象的一条重要思路,目前对黑色素形成代谢的信号通路研究较清楚的有4种:二酯甘油/蛋白激酶C(DAG/PKC)通路^[11-13]、腺苷酸环化酶/cAMP依赖蛋白激酶通路^[14-16]、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路^[17-19]、一氧化氮/环磷酸鸟苷/蛋白激酶G(NO/cGMP/PKG)通路^[20]。涉及到酪氨酸、酪氨酸酶(TYR)多巴(Dopa)、多巴醌(DQ)、多巴色素(DC)小眼畸形相关转录因子等几十种物质和催化酶,其中小眼畸形相关转录因子是参与黑素细胞的发育、分化和功能调节的重要转录因子,它通过调控与黑素细胞发育有关的基因如酪氨酸基因家族的表达从而参与黑色素的形成^[21-22],而酪氨酸酶是一种色素细胞专一性酶能在黑色素体中将黑色素前体氧化为黑色素,其表达和活性决定着黑色素生物合成的速度和产量,因此是黑色素形成的关键酶之一。

白化刺参上调表达的基因涉及到能量代谢相关基因居多,包括ATP合成酶、NADH脱氢酶、细胞色素c氧化酶亚单位III、ADP-核糖基化因子等。目前还没有关于刺参能量代谢与其白化现象发生相关的报道,但是我们相信白化刺参存在有别与普通刺参的能量代谢。高的能量代谢基因表达说明了白化刺参生长代谢过程旺盛,这与白化刺参生长速度快的特性密切相关。至于白化刺参能量代谢是白化刺参生长的一种适应性的新陈代谢,还是导致白化现象本身的一种诱因,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 李成华,崔静,李晔,等. 南移养殖仿刺参(*Stichopus japonicus* Selenka)铁蛋白基因的克隆及表达特征分析[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(4):567-572.
- [2] 赵鹤凌. 刺参 *Apostichopus japonicus* (Selenka)白化特征发生机理的基础研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011.
- [3] He N, Liu H, Xu X, et al. Identification of genes involved in the response of haemocytes of *Penaeus japonicus* by suppression subtractive hybridization (SSH) following microbial challenge[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2004, 17(2):121-128.
- [4] Pan D, He N, Yang Z, et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2005, 29(2):103-112.
- [5] Zhao Z, Yin Z, Weng S, et al. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2007, 22(5):520-534.
- [6] Prado-Alvarez M, Gestal C, Novoa B, et al. Differentially expressed genes of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* against *Perkinsus olseni*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(1):72-83.
- [7] Li C, Chen J, Shi Y, et al. Use of suppressive subtractive hybridization to identify differentially expressed genes in ayu (*Plecoglossus altivelis*) associated with *Listonella anguillarum* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2011, 31(3):500-506.
- [8] 吉成龙,孙国华,杨建敏,等. 刺参(*Apostichopus japonicus*)高温胁迫消减 cDNA 文库的构建与分析[J].

- 海洋与湖沼, 2011, 42(1):60-65.
- [9] 冷向军, 李小勤. 水产动物着色的研究进展[J]. 水产学报, 2006, 30(1):138-142.
- [10] 宋光泉, 阎杰, 王荣辉, 等. 天然虾青素的提取纯化及其应用[J]. 广东化工, 2007, 34(11):63-66.
- [11] 赵鹤凌, 杨红生, 赵欢, 等. 刺参虾青素基因的克隆及不同体色个体间表达差异的分析[J]. 海洋科学, 2012, 36(3):22-28.
- [12] Allan A, Archambault M, Messana E, et al. Topically applied diacylglycerols increase pigmentation in guinea pig skin[J]. The Journal of Investigative Dermatology, 1995, 105(5):687-692.
- [13] Park H, Wu C, Yonemoto L. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes[J]. The Journal of Cell Science, 2006, 395(3):571-578.
- [14] Slominski A, Plonka P, Pisarchik A. Preservation of eumelanin hair pigmentation in proopiomelanocortin-deficient mice on a nonagouti (a/a) genetic background[J]. Endocrinology, 2005, 146(3):1245-1253.
- [15] Lamerson C, Nordlund J. Pigmentary changes in Addison's disease with adrenal insufficiency[M]. Oxford: Oxford University Press, 1998:875-877.
- [16] Krude H, Biebermann H, Luck W. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans[J]. Nature Genetics, 1998, 19(2):155-157.
- [17] Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation[J]. Pigment Cell Research, 2000, 13(2):60-69.
- [18] Al S J, Vinson C, Han J. Regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription by basic region leucine zipper transcription factors[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2005, 96(5):1003-1020.
- [19] Cowan K, Storey K. Mitogen-activated protein kinases: New signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress[J]. The Journal of Experimental Biology, 2003, 206:1107-1115.
- [20] Busca R, Ballotti R. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation[J]. Pigment Cell Research, 2000, 13(2):60-69.
- [21] Dong Y, Cao J, Wang H. Nitric oxide enhances the sensitivity of alpaca melanocytes to respond to α -melanocyte-stimulating hormone by up-regulating melanocortin-1 receptor[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 396(4):849-853.
- [22] Opdecamp K, Nakayama A, Nguyen M, et al. Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: Crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor[J]. Development, 1997, 124: 2377-2386.

Identification of Differentially Expressed Genes Between Albino and Normal *Apostichopus japonicus*

ZHU Lin, GUO Chun-yang, WANG Zhen, LI Cheng-hua*
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To explore the intrinsic molecular issues behind the different growth and resistance, we construct a forward and reverse suppression subtractive hybridization database using albino and normal sea cucumbers. GO analysis indicates that 26 differentially expressed genes are classified into six categories, including ribosomal genes, metabolism related genes cell structure, immune gene, albino related genes and unknown genes. RT-qPCR analysis shows that the relative expression of ADP-ribosylation factor in albino sea cucumber is twice as much as that of normal ones. On the contrary, the relative expression of astacin and microphthalmia-associated transcription factor in albino sea cucumber is 2.6 and 2.1 times higher than normal ones, which is consistent with those recorded in SSH library. The present study provides the basic insight for further understanding the mechanism of colour differentiation for sea cucumbers.

Key words: *Apostichopus japonicus*; color inheritance; SSH; RT-qPCR

(责任编辑 史小丽)