

三联灭活细菌疫苗诱导的大黄鱼肾组织 SMART cDNA 文库的构建

刘国柱¹, 郑文彪^{1, 2}, 陈新华^{1, 2*}

(1. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005)

关键词: 大黄鱼; 三联灭活细菌疫苗; 免疫相关基因; SMART cDNA 文库

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 0253-4193(2007)02-0161-06

1 引言

大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea* (Richardson)) 是我国特有的经济鱼种, 以其味道鲜美, 营养丰富和极高的药用价值而受到青睐, 在大黄鱼人工育苗和网箱养殖等技术相继成熟之后, 人工养殖得到迅猛发展, 仅福建省 2000 年就有养殖网箱约 30 万^[1]. 由于养殖规模的不断扩大和养殖环境日益恶化, 导致大面积细菌性疾病的爆发^[2~3], 给大黄鱼的养殖业造成了巨大的损失. 对于细菌性疾病的防治, 目前主要使用抗生素. 大量、盲目使用抗生素造成了药物残留、耐药性增加、污染环境等一系列不良后果^[6]. 所以从大黄鱼自身的抗病能力入手, 通过提高鱼体的自身免疫力来抵御病原微生物的侵袭是一个很好的途径.

鱼类的免疫系统分为特异性免疫和非特异性免疫. 鱼类特异性免疫系统的激发需要较长的时间 (14 d 左右), 并且温度对它也有一定的影响, 在这期间毒力较强的病原体足以将鱼致死. 而天然免疫是非特异性的, 反应速度快, 一般 1~2 d 即有反应, 并且温度对它影响不大^[7]. 目前认为鱼类天然免疫在抵抗病原体的侵袭中发挥更重要的作用. 近年来, 对于鱼类免疫系统的研究受到广泛的重视, 并取得了重要进展. 至今已经构建了多种鱼的 cDNA 文库, 并获得一些重要的免疫相关基因. 从肽聚糖诱导的鲤鱼 (*Cyprinus*

carpio) 头肾 cDNA 文库中分离到了 LPS 结合蛋白, β 胸腺素, CD18, Ig 重链和轻链, Mx, 白介素 1h, C 型溶菌酶等基因^[8]. 从 HIRAME rhabdovirus (HRV) 病毒诱导的日本比目鱼 (*Paralichthys olivaceus*) 白细胞 cDNA 文库中, 获得了 CD20 抗原, CD8alpha 链, 白介素 6 受体 (IL-6R), 白介素 8 受体 (IL-8R), MHC class II alpha, CD3 和转铁蛋白受体等基因^[9]. 从灭活的草鱼出血病毒诱导的鲫鱼胚胎细胞差减 cDNA 文库中, 分离鉴定了多个干扰素系统基因, 其中 TLR3 能特异地识别 dsRNA 和诱导 I 型干扰素的产生, STAT1 和 JAK1 是干扰素信号通路因子, 另外还有 Mx1, Mx2, Viperin, PKR 和 IFI56 等抗病毒基因^[10]. 这些免疫相关基因的和获得加快了对鱼类免疫机制的了解. 为此, 本研究以三联灭活细菌疫苗免疫大黄鱼, 构建了诱导后肾脏组织 SMART cDNA 文库, 该 cDNA 文库为诱导后表达基因的 EST 分析, 获取大黄鱼抗病相关基因奠定了基础.

2 材料和方法

2.1 材料

大黄鱼购自厦门同安海水养殖场, 溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌 (*V. parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 三联疫苗为本实验室自制保存; mRNA 提取试剂盒购自

收稿日期: 2005 06 29; 修订日期: 2006 03 20.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40476052); 国家海洋局海洋科学基金项目.

作者简介: 刘国柱 (1979—), 男, 河北省唐山市人, 从事鱼类分子免疫学研究. E-mail: lgz2006@sohu.com

* 通讯作者: Chenxinh@tom.com

PROMEGA 公司;文库构建试剂盒 SMART cDNA Library Construction Kit (Catlog #: K1051-1)购自 CLOTECH 公司;大肠杆菌 JM109 电转感受态细胞购自大连宝生物公司;改造的 pcDNA3.0 载体为本室保存;PCR 相关试剂购自华美生物工程公司;其他常规试剂及耗材均为国产。

2.2 肾脏组织的获得及各时段免疫水平的确定

取 12 条暂养的大黄鱼,体长大约 15 cm,每条鱼注射 0.5 mL 混合菌三联灭活疫苗,每种菌的浓度为 1×10^8 个/cm³。分别在注射疫苗后 6, 12, 30, 36 h 取肾脏组织及血液样品,肾脏组织投入液氮中速冻,保存于 -80 °C。

待血清析出后,以 *E. coli* D31 为底物,采用 Boman 及 Hultmark 等的方法^[11,12]进行测定。将底物用 0.1 mol/dm³, pH=6.4 的磷酸钾盐缓冲液配成 $A_{570} = 0.3 \sim 0.5$ 的菌悬液。取 3.0 mL 菌悬液与 50 L 待测血清于试管中混匀,测定其在 570 nm 处的光密度值 A_0 ,然后将试管置于 37 °C 水浴保温 30 min,尔后取出立即冰浴 10 min 以中止反应,测定保温后的 A 值。抗菌活力 U_a 按下式计算: $U_a = ((A_0 - A)/A)^{1/2}$ 。以抗菌活力的值对诱导后时间做曲线,确定抗菌免疫水平。

2.3 mRNA 的提取

取出 -80 °C 保存的所需时段的肾脏组织样品,称重,按照试剂盒说明操作,最后将 mRNA 沉淀溶于去除 RNA 酶的去离子水中,在紫外分光光度计 (Amersham, Ultrospec 2100 pro) 上测定纯度和浓度,1×TAE 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 质量。

2.4 双链 cDNA 的合成

取适量 mRNA 按照试剂盒说明做反转录及 primer extension,取 5 μL primer extension 产物于 1.1%TAE 琼脂糖凝胶上电泳检测。

2.5 cDNA 的纯化与回收

参照试剂盒说明,取 50 μL primer extension 产物,加入 2 μL 蛋白酶 K (20 mg/cm³),于 45 °C 保育 20 min 消化残存的 *Taq* 酶。纯化回收 cDNA,用 *Sfi* I 于 50 °C 酶切 2 h 产生黏性末端。将酶切产物流过 CHROMA SPIN-400 柱,每管过柱收集物取 3 μL 电泳检测,回收较大的 cDNA 片段。

2.6 cDNA 与改造的 pcDNA3.0 载体连接及产物的电转化

改造过的 pcDNA3.0 载体在多克隆位点处加入了 *Sfi* I 的酶切位点^[13],经 *Sfi* I 酶切之后与纯化回收的 cDNA 连接,体系为 pcDNA3.0 载体与 cDNA

以 1:1 的比例连接。连接产物用电穿孔法转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。

2.7 文库质量评价

原始文库容量 在总体积为 7 μL 的回收纯化的 cDNA 中取出 1 μL 与改造的 pcDNA3.0 载体连接,体系为 5 μL,将连接产物稀释至 20 μL,取 1 μL 稀释的连接产物转化 50 μL 大肠杆菌 JM109 电转感受态细胞,复苏后体积为 1 mL,取 10 μL 涂板,以平均每板所长出的菌落数来计算库容。

文库插入片段大小及重组率检测 从原始文库所涂的平板上挑取单菌落,以下述引物做菌落 PCR:

T7: TAATACGACTCACTATAGGG

SP6: ATTTAGGTGACACTATAGAA

程序如下:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,54 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,30 循环;72 °C 延伸 10 min,PCR 产物在 1% 的 1×TAE 琼脂糖凝胶上电泳检测插入片段大小及重组率。

2.8 DNA 测序和序列分析

随机选取经过菌落 PCR 鉴定确认有重组质粒插入的菌落经过过夜培养后送去上海生物工程有限公司测序,在 NCBI 上利用 BLASTX 程序对测得的 DNA 序列进行比对,并对比对结果进行分析。

3 结果

3.1 大黄鱼肾脏组织的获得和免疫水平的确定

取三联灭活疫苗诱导后 6, 12, 30, 36 h 的血清测定抗菌活力,其结果如图所示(图 1),抗菌活力在诱导后 12 h 内无明显变化,12 h 后便缓慢上升,在 30 h 左右达到最大值,之后迅速下降。实验重复 3 次后,确定以三联灭活疫苗诱导后 30 h 的肾脏组织用作为建库样品。

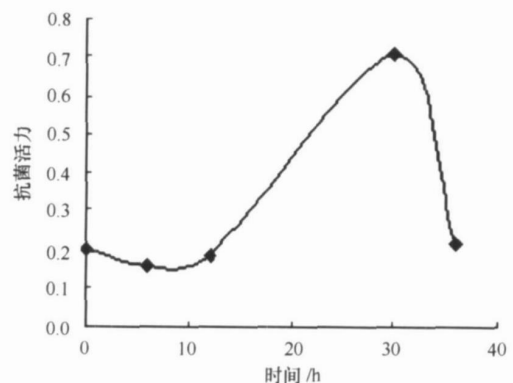


图 1 抗菌活力曲线

3.2 mRNA 的提取

采用 PROMEGA 公司的 PolyA Ttract[®] System 1000 mRNA 纯化试剂盒, 直接利用与磁珠结合的 Oligo(dT) 将 mRNA 与其他的杂质分离开. 省略了提取总 RNA 的步骤, 避免了步骤繁琐而 RNA 又容易被普遍存在的 RNA 酶降解的问题, 所提取的 mRNA 的琼脂糖凝胶电泳照片如图所示, 其大小范围为 0.25 ~ 5 kb, 带型分布良好(图 2), 可以作为建库的原始材料.

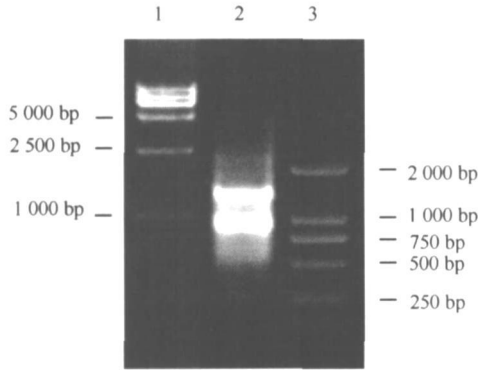


图 2 mRNA 电泳分析

1: 15 000 bp 的 DNA 分子量标准, 2: 三联疫苗诱导后 30 h 的肾脏组织 mRNA, 3: 2 000 bp 的 DNA 分子量标准

3.3 双链 cDNA 的合成

我们采用 clontech 公司的 SMART[™] cDNA Library Construction Kit 试剂盒来合成双链 cDNA. 试剂盒中提供的反转录酶经过了严格的纯化, 并且经过定点突变所得, 和野生型的反转录酶相比, 去除了 Rnase H 活性, 能保证全长的 cDNA 片段的合成.

试剂盒提供了两条引物, 其中 CDS III/3' PCR Primer 含有 Oligo(dT), 能与 mRNA 的 Poly(A) 相结合, 在反转录酶的作用下合成第一链, 并在末端合成 3 个 C, 可以与 SMART IV[™] Oligonucleotide 引物中的 3 个 G 相结合. 在 Advantage 2 Polymerase Mix 作用下, 合成双链 cDNA. 合成的双链 cDNA 产物主要集中在 0.25 ~ 2.5 kb 之间(图 3).

3.4 cDNA 的纯化与回收

在建库的过程中, 利用 CHROMA SPIN - 400 柱子进行 cDNA 纯化与回收这一步起着非常重要的作用, 它去除了 cDNA 中混有的杂蛋白和盐的成分, 并且对 cDNA 进行片段大小的分流, 只回收 500 bp 以上的片段, 从而去除了由一些降解 mRNA 所反转录而来的

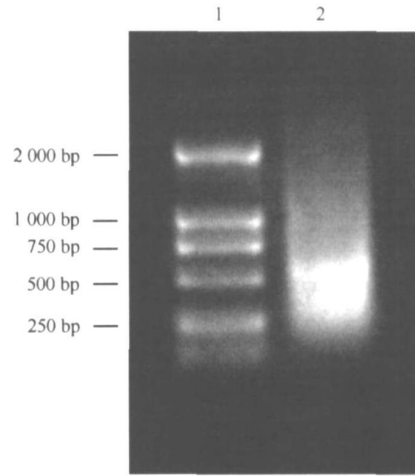


图 3 cDNA 电泳分析

1: 2 000 bp 的 DNA 分子量标准, 2: 三联疫苗诱导后 30 h 肾脏组织 mRNA 逆转录所得 cDNA

小片段部分, 大大增加了 cDNA 文库的质量.

3.5 文库质量评价

按照上述方法所涂的平板上平均长出 10 个单菌落, 由此可推算文库容量为 $10 \times 100 \times 20 \times 7 = 1.4 \times 10^5$ 个克隆. 我们对 133 个单菌落进行了 PCR 鉴定, 只有 3 个没有插入外源片段, 重组率达到了 97.7%, 插入片段大小在 0.25 ~ 2.5 kb 之间(图 4), 完全符合一个 cDNA 文库的标准, 该文库可进行大规模测序然后上网比对的方法鉴定出免疫相关基因, 也可以进行已知目的基因的筛选.

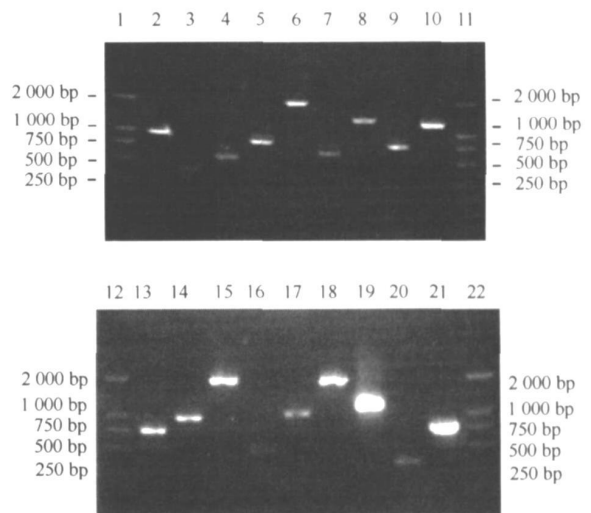


图 4 cDNA 文库插入片段大小检测

1, 11, 12, 22: 2 000 bp 的 DNA 分子量标准; 2 ~ 10, 13 ~ 21: 随机的 cDNA 文库插入片段 PCR 扩增产物

3.6 测序结果

目前已经对随机挑取的 40 个单菌落进行了测序, 测序结果进行了 BLAST 比对分析, 有 15 个序列与已经报道的基因序列有同源性. 其中包括酶类: ATP 合成酶 A 链、细胞色素氧化酶亚基和谷胱甘肽过氧化物酶; 结构基因: β 肌动蛋白、 β 微管蛋白; 信号传导因子: 信号传导 G 蛋白亚基; 免疫相关基因: 趋化因子、蛋白酶体激活亚基、干扰素诱导蛋白 56 和 DRTP1 等等(表 1). 其中蛋白酶体激活亚基 2 基因(PSME2), 干扰素诱导蛋白 56 和 DRTP1 是从中发现的比较有意义的免疫相关基因, 相信对它们的分析研究将有助于我们对相关领域的新知识的了解有着极大的帮助.

4 讨论

肾脏是鱼类最重要的淋巴组织, 是重要的免疫器官, 对鱼类的免疫保护的研究有着重要的作用, 所以本研究选择肾脏作为我们研究的材料. 我们所建的 cDNA 文库有两个优点: 首先它是全长的 cDNA 文库, 通过 EST 大规模测序, 我们在获得免疫相关基因的同时, 也获得了全长基因, 相对于传统方法构建的 cDNA 文库而言, 省略了扩增全长基因的步骤. 另外, 在经过 cDNA 纯化回收后, 很多杂碎的小片段被除去, 大大提高了 cDNA 文库的质量, 为以后的工作奠定了良好的基础. 这一点得到了后面的测序结果和序列分析证明.

表 1 通过 BlastX 比对鉴定的基因

基因	登录号	相似物种	同源蛋白登录号	E 值	同源性(%)	出现次数
ATP synthase A chain	CX348620	<i>Trypanosoma brucei</i>	sp P24499	2.00E-13	48/141 (34)	1
Cytochrome c oxidase subunit III	CX349017	<i>Theragra chalcogramma</i>	dbj BAD27234.1	2.00E-20	50/54 (92)	1
Glutathione peroxidase	CX348759	<i>Danio rerio</i>	gb AA086703.1	3.00E-77	136/180 (75)	1
Signal transduction G protein gamma 5	CX348961	<i>Gallus gallus</i>	ref XP_422375.1	4.00E-21	27/32 (84)	1
chemokine CG like protein	DQ447887	<i>Scophthalmus maximus</i>	gb ABC6904.1	2.00E-17	49/89 (55)	1
Beta actin	CX348628	<i>Pagrus major</i>	dbj BAD88412.1	1.00E-12	222/239 (92)	2
Ribosomal protein L6	CX348731	<i>Ictalurus punctatus</i>	gb AAK95130.1	1.00E-12	34/38 (89)	1
Ribosomal protein L10a	CX348508	<i>Ictalurus punctatus</i>	gb AAK95136.1	1.00E-109	197/214 (92)	2
Tubulin, beta, 2	CX348238	<i>Danio rerio</i>	gb AAQ97859.1	6.00E-52	99/100 (99)	1
Cathepsin B	CX348476	<i>Danio rerio</i>	gb AAH44517.1	8.00E-19	39/42 (92)	1
DRTP1	DQ447886	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	emb CAF91319.1	4.00E-12	60/88 (68)	1
Interferon inducible protein IFI56	CX349181	<i>Taki fugu rubripes</i>	gb AAP59422.1	9.00E-69	122/169 (72)	1
Proteasome activator subunit 2	CX349148	<i>Danio rerio</i>	ref NP_571449.1	3.00E-33	75/147 (51)	1

PSME2 基因编码产生 PA28 β 蛋白, 此蛋白是 PA28 蛋白复合体的一个亚基, 能够与另外一个 PA28 α 亚基形成 PA28-($\alpha\beta$)₃ 复合体^[14], 此 PA28 复合体能够提高 20S 蛋白酶体降解蛋白的能力, 而 20S 蛋白酶体主要产生能结合于主要相容性复合体 I 类(MHC Class I)分子的肽, 从而被提呈到细胞表面为细胞毒素淋巴细胞(CTLs)所识别^[15]. 这一

过程是机体免疫系统中的重要一环, 能够对病原的入侵起到抵制作用. Plk22 基因是在比对中发现的比较好的基因, 它编码一个 88 个氨基酸的蛋白, 与报道的鲑鱼和虹鳟的分化调节因子有着一定的同源性^[16, 17], 除去信号肽部分之后, 它的成熟肽有 10 个半胱氨酸, 并且从序列比对中可以看出它们是相当保守的. Plk22 基因属于一个大的基因超家族, 此

基因家族编码蛇毒液中的神经毒素蛋白、Ly-6 细胞表面抗原蛋白、补体溶细胞作用抑制因子 CD59 蛋白和尿激酶型血纤维蛋白溶酶原激活因子受体等结构相似且相当保守的蛋白^[19], 它们共同的特点含有较多的半胱氨酸使它们的三维结构相当的保守, 由此推测结构提供了它们应有的功能. Plk22 与补体抑制因子有着 30% 以上的同源性, 建议它可能在鱼体内行使补体抑制因子的功能^[17]. 除此之外还发现了一个干扰素诱导蛋白 (IFI56) 基因的全长 cDNA, 1311 bp 的编码区编码 437 个氨基酸残基的分子量为 50KD 的蛋白, 和哺乳动物中 56KD 的干扰素诱导蛋白在分子量上有一定的差别但是序列有着 20% 以上的同源性, 这和已经发现的鲤鱼 (*Carassius auratus*) 的 IFI56 基因的情况是一样的^[18], 同时利用鱼类已经发现的 IFI56 蛋白进行比对, 结果发现与东方红鳍鲃 (*Fugu rubripes*) IFI56 有着最高的 54.9% 的同源性. IFI56 是干扰素诱导型的, 能起到抗病毒作用, 报道表明它能与翻译起始因子 eIF

-3 相互作用, 从而阻止细胞蛋白的合成^[19,20], 这可以是其抗病毒的途径.

除了以上比较重要的免疫相关基因外, 在所测序列当中也发现了一些其他的基因. 其中包括细胞色素氧化酶、蛋白酶等一些酶类, 还有 MHC I 类系统的一些分子、细胞因子和补体系统分子等一些比较有趣的基因, 进一步的序列分析还在进行中, 相信对这些基因的分析研究能够填补我们在鱼类免疫系统方面的一些空白, 使我们对鱼类免疫系统有更深入的了解.

对于海水鱼类病害的防治策略应该以防为主, 增强养殖品种的抗病能力是我们要采取的首选措施, 所以鱼类免疫相关的研究就显得尤为重要. 截至目前, 有关大黄鱼免疫相关基因及免疫的分子机制研究仍是空白, 本文对大黄鱼 SMART cDNA 文库的构建以及正在进行的 EST 大规模测序, 将对大黄鱼抗病相关基因的表达调控和抗病机制的研究起到重要的作用.

参考文献:

- [1] 张彩兰, 刘家富, 李雅瑾, 等. 福建省大黄鱼养殖现状分析与对策[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(1): 77-83.
- [2] 林克冰, 周宸, 刘家富, 等. 海水网箱养殖大黄鱼病原菌研究[J]. 海洋科学, 1999, 4: 58-62.
- [3] 林克冰, 周宸. 海水网箱养殖大黄鱼弧菌病的病原菌[J]. 宁波大学学报, 1999, 12(增刊): 16-19.
- [4] 林星, 肖懿哲. 大黄鱼弧菌病的诊治[J]. 水产养殖, 1998, 4: 29-32.
- [5] 王军. 闽南地区养殖大黄鱼细菌性疾病的病原生物学研究[J]. 厦门大学学报, 2001, 40(1): 85-91.
- [6] 潘连德, 陈辉. 药物防治的临床药理学与水产药理学问题[J]. 水产科技情报, 1998, 25(4): 169-173.
- [7] SECOMBES C J, WANG T, HONG S, et al. Cytokines and innate immunity of fish[J]. Dev Comp Immunol 2001, 25: 713-723.
- [8] TOMOYA K, ARANYA P, MASA HIRO S. The analysis of expressed genes in head kidney of common carp *Cyprinus carpio* L. stimulated with peptidoglycan[J]. Aquaculture, 2003, 235: 37-52.
- [9] BO-HYE N, EIICHI Y, IKUO H, et al. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with *Hirame rhabdovirus*[J]. Dev Comp Immunol 2000, 24: 13-24.
- [10] ZHANG Yi bing, GUI Jian fang. Cloning, identification and characterization of interferon system genes in Crucian Carp (*Carassius auratus* L.)[J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2004, 21(3): 418-426.
- [11] HULTMARK D. Insect immunity: purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*[J]. Eur J Biochem, 1980, 106: 7-16.
- [12] BOMAN H G. Insect immunity: Characteristics of an inducible cell free antibacterial reaction in hemolymph of *Samia Cynthia praeae*[J]. Insect Immune 1974, 10: 136-145.
- [13] MOUC Y, ZHANG S C, LIN J H, et al. Est analysis of mRNAs expressed in neurola of Chinese amphioxus[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299: 74-84.
- [14] SONG X, MOTT J D, von KAMPEN J, et al. A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28[J]. J Biol Chem, 1996, 42: 26410-26417.
- [15] LAARS S, ALEXANDER K, NUSSBAUM, et al. The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing[J]. Immunol Today, 2000, 21(7): 317-319.
- [16] LEE P H, GOETZ F W. Characterization of a novel cDNA obtained through differential display PCR of phorbol ester stimulated ovarian tissue from the brook trout (*Salvelinus fontinalis*)[J]. Mol Reprod Dev, 1998, 49: 112-118.
- [17] BAYNE C J, GERWICK L, FUJIKI K, et al. Immune relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization[J]. Dev Comp Immunol 2001, 25: 205-217.

- [18] ZHANG Yi bing, G UI Jian fang. Identification and expression analysis of two IFN inducible genes in Crucian Carp (*Carassius auratus* L.) [J] . *Genes* 2004, 325: 43 – 51.
- [19] G U O J J, S E N G C. Characterization of the interaction between the interferon induce protein p56 and the Int6 protein encoded by a locus of insertion of the mouse mammary tumor virus [J] . *J Virol* 2000, 74: 1 892 – 1 899.
- [20] G U O J J, H U I D J, M E R R I C K W, et al. A new pathway of translational regulation mediated by eukaryotic initiation factor 3 [J] . *Embo J*, 2000, 19: 6 891 – 6 899.

Construction of SMART cDNA library from kidney of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) stimulated with the inactivated trivalent bacteria vaccine

LIU Guo zhu¹, ZHENG Wen biao^{1,2}, CHEN Xin hua¹

(1. *Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China*; 2. *Department of Biology, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China*)

Key words: large yellow croaker; inactivated trivalent bacteria vaccine; immune relevant gene; SMART cDNA library