

用 cDNA 芯片技术筛选 中华绒螯蟹卵巢发育相关基因

马长艳^{1,2}, 郭豫杰¹, 周开亚¹

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 江苏 南京 210046)

(2 南京医科大学发育遗传学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 为了克隆中华绒螯蟹卵巢发育相关基因, 我们构建了中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库. 本研究用 cDNA 芯片技术对中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库进行了初步筛选, 并从 cDNA 芯片筛选的正向差减文库中随机选取 50 个克隆进行序列测定. 结果共获得 2 倍以上差异表达克隆 167 个, 其中 III 期高表达克隆 104 个, II 期高表达克隆 63 个. 正向差减文库中共获得 7 个独立的 EST (expressed sequence tag, EST). 同源性分析结果表明, 这些 EST 皆为新的 EST, dbEST 登录号分别为: CA591892, CA591893, CA591894, CA591895, CA591896, CA591897 和 CA591898. 本研究结果为进一步克隆中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的全长 cDNA 序列并研究其功能, 阐明中华绒螯蟹卵巢发育的分子机理奠定了重要的前期工作基础.

[关键词] 中华绒螯蟹, 卵巢, 抑制性差减杂交, cDNA 芯片, 表达序列标签

[中图分类号] Q75 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)03-0076-05

Screening the Differentially Expressed Genes Related to the Ovarian Development of Chinese Mitten Crab (*Eriocheir japonica sinensis*) Using cDNA Macroarray

Ma Changyan^{1,2}, Guo Yujie¹, Zhou Kaiya¹

(1. Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

(2. Department of Developmental Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract To clone genes which are related to the ovarian development of Chinese mitten crab, the subtracted libraries have previously been constructed. In the present study, the cDNA macroarray was prepared to screen the differentially expressed genes and fifty clones identified from the forward subtracted cDNA library were selected randomly and sequenced. In total, 167 clones whose signal difference was > 2 folds were obtained. Of the differentially expressed clones, 104 clones were highly expressed in the ovary at stage III, 63 clones were highly expressed in the ovary at stage II. Moreover, seven independent ESTs were obtained from the forward subtracted cDNA library. Homology analysis showed that there aren't sequences significantly matching to these ESTs. So they were deduced to be novel ESTs, and all of them were deposited in dbEST. The accession numbers are CA591892, CA591893, CA591894, CA591895, CA591896, CA591897 and CA591898, respectively.

Key words *Eriocheir japonica sinensis*, ovary, suppression subtractive hybridization (SSH), cDNA macroarray, expressed sequence tag

真核生物的体细胞包含个体发育所需的全部遗传信息, 但不同组织的细胞及同一组织在不同发育阶段或不同的生理条件下, 只表达其中一部分遗传信息, 此即基因的选择性表达或差异表达. 基因表达的差异决定了所有的生命过程, 如生长、发育、分化、生殖、衰老和死亡等. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir japonica sinensis*)

收稿日期: 2010-06-22

基金项目: 国家自然科学基金 (30870286)、国家自然科学基金重点项目 (30630010).

通讯联系人: 周开亚, 教授, 研究方向: 动物学. E-mail: kyzhou@126.com

sis)又名河蟹、大闸蟹、毛蟹, 是我国重要的经济蟹类. 目前关于中华绒螯蟹的研究主要集中在蟹苗培育、饲养、疾病^[1-4]以及分子系统学等方面^[5-7], 中华绒螯蟹卵巢发育的分子机理目前还不清楚.

差减 cDNA 文库可以反映两种组织之间或同一组织在不同生理状态或不同发育时期的差异表达基因. 因此, 构建差减文库是用来研究基因差异表达及克隆新基因的理想方法. 抑制性差减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 是 Diatchenko 等^[8]首先报道的一种以抑制性 PCR 反应为基础的 cDNA 杂交方法. 我们应用该技术成功构建了中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库, 其中正、反向差减 cDNA 文库分别含有 863 和 360 个阳性克隆^[9]. 本研究在前期工作的基础上, PCR 扩增了中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库中的插入片段并点制 cDNA 芯片, 将 II 期和 II 期卵巢的 mRNA 反转录标记成的 cDNA 探针和 cDNA 芯片进行杂交和分析. 从 cDNA 芯片鉴定出的差异表达克隆中随机选取 50 个克隆进行测序并进行了序列的同源性分析. 本研究结果为进一步克隆中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的全长 cDNA 序列并研究其功能, 阐明中华绒螯蟹卵巢发育的分子机理奠定了重要的前期工作基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物材料

分别处于卵巢发育 II 期和 II 期的中华绒螯蟹, 由安徽芜湖龙湖水产养殖场提供.

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒 (Trizol Reagent, Gibco), mRNA 纯化试剂盒 (OligotexTM mRNA mini kit, Qiagen), Taq DNA 聚合酶 (Promega), DL 2 000 Marker (大连宝生物工程公司).

1.2 方法

1.2.1 组织总 RNA 的提取

分批将同一水池、同批放养和同样饲养条件下的中华绒螯蟹的卵巢快速取下, 放于液氮中保存. 将液氮保存的 II 期和 II 期卵巢组织用 Trizol 试剂提取总 RNA, 每期各提 3~4 只卵巢. 然后将提取的 RNA 分期等量合并. 具体操作按说明书进行.

1.2.2 mRNA 的分离纯化

用约 300 μ g 合并后的总 RNA 分离纯化 mRNA, 具体操作按说明书进行. 纯化完毕取 2 μ L 电泳鉴定其质量, 其余的样品保存于 -70℃ 冰箱备用.

1.2.3 cDNA 芯片的制备

将构建的差减 cDNA 文库^[9]中的所有克隆按 1:100 的比例分别转接于 1 ml Amp⁺ 的液体 LB 中, 37℃ 220 r/min 振荡培养过夜, 碱裂解法提取质粒. 用 SP6 和 PinPoint 引物扩增重组质粒中的插入片段.

使用 TAS BioRobotics 公司的自动点膜仪点制 cDNA 芯片. 固相载体采用 8×12 cm 尼龙膜, 每个克隆的 PCR 产物点 2 个点, 每张膜上共点 2 486 个点. 每个点的点样量约 10 ng. 待尼龙膜晾干后, 进行紫外线交联固定.

1.2.4 cDNA 探针的制备和杂交

将从 II 期和 II 期卵巢纯化的 mRNA 反转录成 cDNA, 并用 ³²P-dATP 标记成探针. 将点制的 cDNA 芯片和探针杂交, 并进行洗膜和信号的扫描与分析. 共统计 4 个参数: ① 阳性率 (pp): 每张膜上信号值大于 2 的点数占膜上总点数的比值; ② double 点 R²: 每张膜上信号值均大于 2 的 double 点的相关系数; ③ double 点斜率: double 点回归线的斜率; ④ double 点 Pvar: 每张膜上提取信号值均大于 2 的 double 点后, 大于 2 倍差异的基因数占总数的比值. 通过以上各参数的统计, 提供 cDNA 芯片杂交的质控数据.

1.2.5 质粒提取及序列测定

将 cDNA 芯片筛选的部分差异表达克隆从 -70℃ 冰箱中取出进行放大培养, 即用取样器沾一点菌液于 1 ml Amp⁺ 的液体 LB 中 37℃ 220 r/min 振荡培养过夜. 质粒的提取按试剂盒 (Promega) 说明书进行, 并取 2 μ L 质粒于 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳检测. 根据质粒浓度确定测序反应的上样量.

测序反应按以下条件进行: 首先将质粒 98℃ 变性 4 min, 然后立即置于冰水中放置 2 min. 在 0.2 mL 薄壁管中依次加入下列试剂: Mix 2.5 μ L, SP₆ 或 PinPoint (0.8 μ mol/L) 引物 2.5 μ L, 质粒: 2.0 μ L, 然后用

灭菌水补齐至 10.0 μL. 反应程序: 95℃ 2 m in, 96℃ 20 s, 50℃ 5 s, 60℃ 4 m in, 共 30 个循环, 最后 12℃ 2 m in. 测序反应产物纯化后于 ABI 310 遗传分析仪上进行序列测定.

1. 2. 6 序列的同源性分析

运行 blastx 程序将获得的 EST 序列在蛋白库 (Sw issP rot) 中进行同源性比对分析.

2 结果

2 1 cDNA 芯片杂交信号数据

cDNA 芯片杂交信号数据见表 1. 从表 1 的数据可以看出, 两张芯片的质控参数包括阳性率、double 点 R²、double 点斜率和 double 点 Pvar 均在可信范围之内 (与参考值相比), 表明两张芯片的杂交信号较好.

2 2 样品对散点图

cDNA 芯片的散点分布见图 1. 其中 x 轴为 II 期卵巢的杂交信号数值, y 轴为 III 期卵巢的杂交信号数值. 每 1 个数据点代表芯片上 1 个基因点的杂交信号. y 值与 x 值的比值 > 2 的代表 II 期卵巢高表达的基因, x 值与 y 值的比值 > 2 的代表 II 期卵巢高表达的基因. 从图中可以看出 II 期卵巢高表达的基因远多于 II 期卵巢高表达的基因.

2. 3 cDNA 芯片杂交结果

cDNA 芯片杂交信号分析后共获得 2 倍以上差异表达克隆 167 个. 其中 II 期高表达克隆 104 个, II 期高表达克隆 63 个, 芯片杂交图见图 2

表 1 cDNA 芯片杂交的质控参数

Table 1 Quality control parameters of cDNA macroarray hybridization

| | | 实验值 | 参考值 |
|-------------------------|-------|--------|---------|
| 阳性率 (pp) | II 期 | 78% | > 30% |
| | III 期 | 84% | > 30% |
| Double 点 R ² | II 期 | 0.99 | > 0.85 |
| | III 期 | 0.99 | > 0.85 |
| Double 点斜率 | II 期 | 1.0 | 0.9~1.1 |
| | III 期 | 1.0 | 0.9~1.1 |
| Double 点 Pvar | II 期 | 16.86% | < 25% |
| | III 期 | 5.79% | < 25% |

注: ① 阳性率 (pp): 每张膜上信号值大于 2 的点数占膜上总点数的比值; ② double 点 R²: 每张膜上信号值均大于 2 的 double 点的相关系数; ③ double 点斜率: double 点回归线的斜率; ④ double 点 Pvar 每张膜上提取信号值均大于 2 的 double 点后, 大于 2 倍差异的基因数占总数的比值.

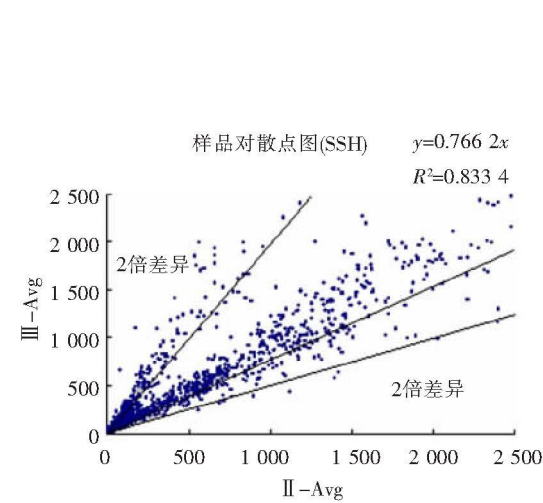


图 1 cDNA 芯片杂交信号散点图

Fig.1 The scattering points scanned according to the hybridized signals

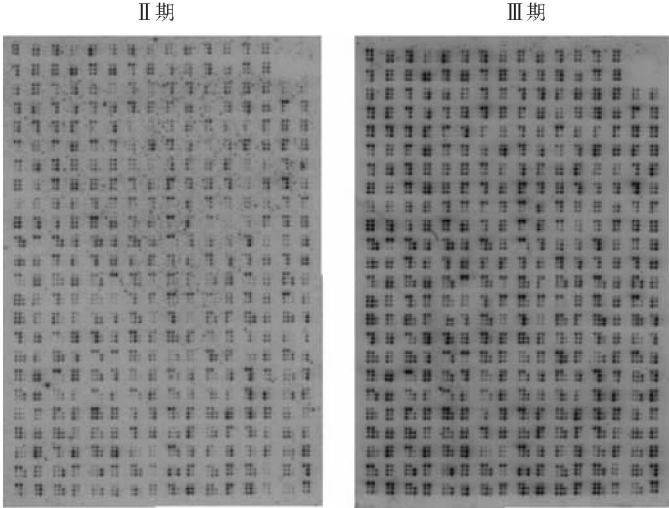


图 2 cDNA 芯片杂交扫描图

Fig.2 Scanning photograph of cDNA macroarray hybridization

2. 4 差异表达克隆的序列测定

正向差减文库中共测了 50 个克隆, 除了重复测序, 结果共获得 7 个独立的序列. 这 7 个 EST 的序列分别为:

F359
CTTTGACCTATA CAG CGT CGA TCGCA CCA CTGA TTT CGATTACTTCTTCGA GCTGCTCCTCCAG CA CCAAA TCCCCTCCGTCTGGA CCA
GGGA CCTTGCCCTCCA CAG CG CCCTATGAAA TCCGGG GCTCCATCA CCAGG TCCGG GGACTCTACGGCAGG CCAAGA CTG CCTCTCG CTG
GAG GCTTCCA CA GACGGCCTTCTCTCTCCAGGA CTCTTGCTCCGACGG AAGGCCGCCG TCTGCGTGG CTCATTGGCAGTA GATAAG

TTTGTCAA CAA CCTG CTT ATCATTTG TGTAATAAA TGTG CTCTGAAA AAAAAAAAA AAAAAAAAA AAA ||
F386
ACCGCCCA CTG CA CATGGAC ATCTGGA TCCCCCGCGAACTCTCCG GCGATGTGGACGGTATCTGCGGCCA CTTCA ACTACAACGCCA CG
GATGACTTCACCGCCG CCACGGGAGA GATCCTTCCCCTCGA GCCATTCCCGCTCAA CTTCCCGACATG CA CTGG CGG GCTCCAGA CGG
CGCATCGCCCTTGCA ATGCCCATGATCACCACCTCCATGTGTAA CGGT ||
F33
ACCGTTA CA CATGGAGGTGGTTAA CCTGGGGTCATTGCAAGGGG CGA TCGGCTGGTCTG GAGCCCG CCAGTGCA TGTGGGGGA AGTTGA
CGGGGAA TGG CTGAGG GGAAGGA TCTCTCCCGTGGCGGCGGTGAA GTCATCCGTGG CGTTGTAG TTGAA GTGG CCGCAGTATACCGTC
CACATCGCCGGAGAGTTGCGGGGGATCCAGA TGTCCATGTGCA GTGGG CAGT ||
F459
ACAGGA GCG GCCCAGCAGGTCTTCGTCCA GCA GCA GCCTGAGCCA CCGG TGTTTGTG CAG CCTGAG CCACAGCAGGTGTTTGTGCAGC
CCCAG CCA CGCCCATGTTCCAGATGCTCCCTCGTTCTCA CAG CAGG CGG CGG TGATCCAGAG CGTCCAG CCGCAAGTGTCTTCCGCC
TGTCGG CCA CTTA CTCCTGG TCCA CA CCACCTACCAA GGCCG AGTCTA CCCTCTCTCTGGTG CAA CCTG CCGGCCA CCGTTTCTC
CCAGTCCGCCG CCAGAGA CTACTGCCGCG GCCTCGG GCGA GTAA CGG TGATGA ACCAG CG CGG CAG CTTTGA CCTATACA GCGTCCGA
TCG CACTA CTG CTTTCGATTACTTT ||
F334
ACCCGTAATA TCCA CGG CCATA ACCA CCGGA CCGGCCA CTTCTCTA TAA CCGCCA TAGCTTCCGTAG CGG CTG CCGCCTTGA CTCCA
TAGCCG CCGTCATAA CTTCCA TGGTGG CTA CCGTA GCGG CCGCCA TAA CTTCCATA TCG CTA CCGTA GCGG CTGCCATAACTTCCATA
ACCGTGCCGTAG CTTCCGTAA CTG CCCC CGG ATGT CCCC CG CCGTAG GACTGGCCGCCA TAGCTCCGTAGCTGGTA AGGCCGCCCG
CGCGTCCCTA CGG CCATGGCTTGGG TCA GGCATGGG ATTAG CCATA CCGGAGG CCACCAA CA CA CAGG CAA AGCACGCCGAA CA CA
G CTTTGA CATG TTGA CTTCA AATGTG ||
F315
ACCG CTGCCTGACTTCCATAA CCG CTG CCATAA CCGGTGCCCTTGA CTTCCATAA CCG CTG CCGTA CCGCTGCCTTGA CTTCCA TAA
CCGCTGCCA TGACTGT CATACCGTTGTCA TAGCTCCGTAACGTGTCTCCGGGA CGG CCCC CG CCGTA GGA CTGG CCGCCA TAG CTCCC
GTA GCGGTATGG CTTGGGT CAG GCA TGGGA TTAG CCATAG CTGCG GCCA CCAACACACAGGCAAAG CA CGG CGAA CA CAG CCTTCG
ACATG GTGA CTTCAAA ACGTGGG ||
F24
CCCGTTTGAA GTCACCA TGTGG CAAGG CTGTGTTGG CCGTGCTTTG CCTGTGTGTG TTGGTGGCCG CAG CTATGG CTAATCCCATGCCT
GACCAAGCCA TACCGGCTACGGGAG CTA TGG CGG CCACTCTACGGCGGGGG CCGTCCCGGTAGG CAGTTA CCGAG GCTATGG CAG CG
GTTATGG CAGTCA TGG CAG CGGTTATGGA AGTCAAGG CAG CG GGTAG CCG CAG CGGTTATGGA AGTCAAGG CAG CCGGTTATGCA GCG G
TTATGGAAGTCAAGG CAG CGGGT ||

2.5 序列的同源性分析

以上 7 个 EST 与蛋白库 (Sw issProt) 中 124 155 个序列的比对结果表明: 这 7 个 EST 在 Sw issProt 数据库
中均未发现其同源匹配序列, 因此我们推测它们均为新的 EST, 并将它们登录 EST 数据库. 它们的
dbEST 登录号分别为: EST001(F359 CA591892); EST002(F386 CA591893); EST003(F33 CA591894);
EST004 (F459 CA591895); EST005 (F334 CA591896); EST006 (F315 CA591897); EST007 (F24
CA591898).

3 讨论

抑制性差减杂交技术的主要优点在于该方法在杂交过程中使用了抑制性 PCR 技术, 可使低丰度的差
异表达基因得到富集. 但由于在实际操作过程中 driver cDNA 和 tester cDNA 比例上的不协调及杂交效率
等因素的影响, 使该方法获得的差异表达克隆具有一定的假阳性率. 即使如此, SSH 的假阳性率较 DD -
RT PCR 要低得多, 据报道后者的假阳性率可高达 90%. 但随之而来的 SSH 方法获得的大量差异表达克隆
的鉴定是一项费时而又繁重的工作. Yang 等^[10]于 1999 年首次将 cDNA 芯片的方法和 SSH 结合起来成功
地用于乳腺癌的研究. 其后, 陆续有将这两种方法结合起来用于差异表达基因研究的报道^[11-15]. cDNA 芯
片和 SSH 的结合被认为是当前分离差异表达基因的最佳策略之一^[10-11]. 本研究将 SSH 结合 cDNA 芯片的
方法用于中华绒螯蟹卵巢发育相关基因的鉴定、分离, 这是将 SSH 结合 cDNA 芯片的方法用于甲壳类功
能基因研究的首次报道.

从表 1 可以看出, cDNA 芯片杂交实验的各个质控参数皆符合质控标准, 本部分实验总体正常. 但鉴
定出的差异表达克隆只有 167 个, SSH 的阳性率只有 15% 左右 (芯片上有效基因数 1100 个). 这可能是由

于芯片本身的灵敏度造成的. 一方面, 当一个基因在 2 张膜上的杂交信号过强, 乃至饱和时, 即使是差异表达基因也有可能被忽略掉; 另一方面, 当某一基因在 2 张膜上的杂交信号过弱时, 这个基因也不参与统计分析, 这就有可能掩盖掉部分差异表达基因. 因此, 基因芯片目前还存在有待改进之处: (1) 应解决高度密集分子之间杂交信号的干扰问题; (2) 灵敏度有待进一步提高; (3) 数据处理时有待于建立一种更为科学、合理的均一化方法.

[参考文献]

- [1] Li H D, Yu G M, Fan J R, et al. Experiments on the Culture of Young Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) [M]. Beijing: China Ocean Press, 1991, 93-98.
- [2] Mu Y Y, Shin K F, Guo J Y. Effects of protein level in isocaloric diets on growth performance of the juvenile Chinese hairy crab, *Eriocheir sinensis* [J]. Aquaculture, 1998, 165: 139-148.
- [3] Wang W, Zhu N, Gu Z, et al. Study on the transmission of tremor disease in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea Decapoda) [J]. J Invertebr Pathol, 1998, 81: 202-204.
- [4] Jin G, Xie P, Li Z. Food habits of 2-year-old Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*, stocked in Lake Baogan [J]. J of Freshwater Ecology, 2003, 18(3): 369-375.
- [5] Tang B, Zhou K, Song D, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 29(2): 309-316.
- [6] Sun H, Zhou K, Song D. Mitochondrial genome of the Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis* (Brachyura: Thoracotremata: Grapsoidea) reveals a novel gene order and two target regions of gene rearrangements [J]. Gene, 2005, 349: 207-217.
- [7] Wang C, Li C, Li S. Mitochondrial DNA-inferred population structure and demographic history of the mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) found along the coast of mainland China [J]. Mol Ecol, 2008, 17(15): 3515-3527.
- [8] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [9] 马长艳, 周开亚, 郭豫杰, 等. 中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库的构建 [J]. 动物学研究, 2003, 24(1): 53-56.
- [10] Yang G P, Ross D T, Kuang W W, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1517-1523.
- [11] Voblet C, Duplessis S, Encelot N, et al. Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus*-*Isolihus tinctorius* ecto-mycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs [J]. Plant J, 2001, 25(2): 181-191.
- [12] Porkka K P, Visakorpi T. Detection of differentially expressed genes in prostate cancer by combining suppression subtractive hybridization and cDNA library array [J]. J Pathol, 2001, 193(1): 73-79.
- [13] Li X D, Essayan D M, Liu M C, et al. Profiling of differential gene expression in activated, allergen-specific human Th2 cells [J]. Genes Immun, 2001, 2(2): 88-98.
- [14] Gardino C, Swerdlow H, Mode A. Growth hormone regulation of rat liver gene expression assessed by SSH and microarray [J]. Mol Cell Endocrinol, 2002, 190(1-2): 125-133.
- [15] Hadjagryou M, Lombardo F, Zhao S, et al. Transcriptional profiling of bone regeneration: Insight into the molecular complexity of wound repair [J]. J Biol Chem, 2002, 277(33): 30177-30182.

[责任编辑: 孙德泉]