

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00024

凡纳滨对虾 *ANT2* 基因的克隆及低温表达谱分析

殷勤^{1,2} 崔亮¹ 彭金霞¹ 韦嫔媛¹ 谢达祥¹ 陈秀荔¹
王志伟² 李奎² 陈晓汉¹

(1. 广西壮族自治区水产研究所, 广西水产遗传育种与健康养殖重点实验室, 南宁 530021;

2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100094)

摘要: 为研究凡纳滨对虾适应低温的分子机理, 实验对从低温处理凡纳滨对虾抑制性消减文库中筛选出的一个 360 bp EST 序列进行了研究。首先, 同源比对显示该 EST 片段与其他物种的 *ANT2* 基因高度同源, 命名为凡纳滨对虾 *ANT2* 基因(*LVANT2*); 其次, 通过构建凡纳滨对虾肝胰腺全长 cDNA 文库, PCR 扩增获得 *LVANT2* 基因的全长 cDNA 1540 bp, 其中包括 1011 bp 的完整开放阅读框, 编码 336 个氨基酸残基。然后, 对基因进行了不同组织和低温处理的表达谱分析: (1)组织表达谱的结果显示, 该基因在凡纳滨对虾肌肉组织中表达量最高; (2)在不同低温处理下的表达结果显示, 该基因在 15℃ 处理下基因表达量发生显著变化, 13℃ 开始呈下调表达, 11℃ 时表达量又升高; 13℃ 低温处理不同时间发现该基因在 12h 内表达量发生显著变化, 48h 后表达量最高。 *LVANT2* 基因的低温诱导表达模式说明其可能在凡纳滨对虾低温适应中发挥作用。

关键词: *LVANT2*; 表达量; 抑制性消减文库; cDNA 全长文库

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2012)01-0024-05

传统育种主要根据个体的表型进行评价和选择。由于表型性状不仅取决于遗传组成, 也受控于环境条件, 有时环境条件的影响可掩盖基因型上的差异。因此, 仅从表型选择显然是不理想的。分子标记技术的建立, 使得遗传育种进入了一个新阶段。新技术和传统育种方法相结合能大大加速育种工作进程。因此, 与经济性状相关基因的克隆和鉴定对于标记辅助选择的应用有重大意义。

通过对比两种或多种处于不同状态的个体的基因表达差异, 有助于基因功能和表达模式的研究。mRNA 差异显示技术^[1]、cDNA 代表性差异分析^[2]、基因表达系列分析^[3]、消减杂交^[4]、抑制消减杂交^[5, 6]和 cDNA-AFLP^[7]技术是当前差异表达基因克隆的主要采样的方法。其中抑制消减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)是以抑制性 PCR 技术和消减杂交技术为基础来研究基因的表达差异, 目

前已经成为研究动植物生长、发育、抗逆、抗病等生理过程中相关基因差异表达及克隆的高效方法。

腺苷酸转移酶(Adenine Nucleotide Translocase, ANT)是真核生物线粒体内膜上最丰富的蛋白质家族成员, 作为代谢物载体参与线粒体的各种活动^[8-10]。在人类中发现 ANT1、ANT2 和 ANT3 这 3 个不同异构体, 并且不同异构体有着不同的染色体定位和组织表达模式^[11]。ANT 蛋白通过 2 个分别含有 ATP/ADP 结合位点的亚基的构象变化来实现细胞质中 ADP 和线粒体内 ATP 间的跨膜交换^[12], 是生物体内能量产生和消耗的重要连接^[13]。但是目前国内还很少有 *ANT2* 基因与低温相关性的报道。为开展耐寒选育相关分子辅助育种研究, 我们构建了凡纳滨对虾低温抑制消减文库, 并分析了部分低温上调表达基因与耐寒性状的相关性, 在此库中筛选获得了 360 bp 的 *ANT2* 基因片段, 然后通过全长文库

收稿日期: 2010-07-16; 修订日期: 2011-05-24

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划(桂科攻 10100007-2); 广西壮族自治区直属公益性科研院所基本科研业务费(2060302 GXIF-2010-04); 现代农业产业技术体系建设专项资金(编号: CARS-47)资助

作者简介: 殷勤(1982—), 男, 湖北恩施人; 硕士; 主要从事动物遗传育种研究。E-mail: hnyinqin@yahoo.com.cn

通讯作者: 陈晓汉, E-mail: chnxhn@163.com

克隆获得该基因全长, 并对其进行了不同组织和低温处理下表达模式的研究, 结果显示凡纳滨对虾 *ANT2* 基因呈低温诱导表达, 可能在低温适应中起作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料部分表述调整为:

以国家级广西南美白对虾遗传育种中心 2009 年建立的无特定病原凡纳滨对虾家系为材料, 家系对虾养殖 2 个月, 大小为 10—15 g。对虾在实验水族箱常温暂养 7d 后进行降温处理(水温从 28℃ 降至 11℃, 每 12h 降低 1℃), 降至目的温度后保持 36h 开始取样, 剪取每尾虾肝胰腺组织适量于冻存管中, 液氮速冻用于 RNA 抽提。采集的样品包括常温对虾的心、肝胰腺、肌肉、胃、肠、眼柄及不同温度处理不同时间组对虾的肝胰腺。每个降温组及常温组各采集 3—5 尾虾的组织。

1.2 实验主要试剂

总 RNA 提取试剂 Tizol 为 invitrogen 公司产品, RT 逆转录试剂盒为 TOYOBO 公司产品, SYBR Green I 为 ABI 公司产品, dNTPs, *Taq* 酶和 *Taq* I 限制性内切酶均为 Takara 公司产品, 克隆试剂盒为 Takara 公司的 pMD18-T 克隆试剂盒, PCR 扩增产物回收用 Tiangen 公司的胶回收试剂盒。

1.3 RNA 提取与逆转录部分表述调整为:

将液氮冻存的组织块置 240 度高温烘烤过的研钵中加液氮研碎, 放入适量 TRIzol 溶解, 按 TRIzol 产品说明书步骤提取总 RNA, 抽提出的 RNA 通过 1.2% 的琼脂糖电泳分析 RNA 的完整性。用紫外分光光度计测定 RNA 的 *A*₂₆₀ 和 *A*₂₈₀ 值, 用于判断 RNA 的纯度并计算浓度, RNA 的 *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 比值均在 1.8—2.0。每个样品取相同质量的 RNA, 按照逆转录酶 M-MLV Reverse Transcriptase 的操作说明进行逆转录获得 cDNA, 作为定量 PCR 扩增的模板。

1.4 凡纳滨对虾全长文库筛选基因全长

全长 cDNA 文库构建按照 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit 说明书进行, 连接载体为含 M13 引物结合位点的 PGEM-T 载体。通过同源克隆获得的 *LVANT2* 基因部分序列设计引物, 引物序列为: 上游引物 5'-CGCCTCCAAGCAGATCAC-3', 下游引物 5'-CCAGGACAAGGGCACCAC-3', PCR

产物长度大小为 746 bp。分别用 M13F(5'-TGTAAC GACGGCCAGT-3')与目的基因下游引物、M13R(5'-G TTTTCCCAGTCACGAC-3')与目的基因上游引物扩增 cDNA 全长文库获得 *LVANT2* 基因全长。

1.5 抑制消减杂交

将凡纳滨对虾在 13℃ 下饲养 36h, 然后取其肝胰腺提取总 RNA 作为实验组样品, 常温养殖对虾肝胰腺组织总 RNA 为对照样品。具体操作按照 Clontech 公司的 PCR SelectTM cDNA Subtraction Kit 说明书进行。简述如下: 首先把 mRNA 反转录成 cDNA, 处理和对照 cDNA 分别为 Tester 和 Driver, 然后用 *Rsa* I 酶切, 将酶切过的 Tester cDNA 均分为二, 分别加上接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 再与过量的 Driver cDNA 进行两轮杂交; 然后将杂交产物进行两轮选择性 PCR 扩增, 使 Tester cDNA 中差异表达的片段得到富集, 这样得到的是正向差减杂交 cDNA 二次 PCR 产物。如果将酶切过的 Driver cDNA 均分为二, 分别加上接头 Adapter 1 和 Adapter 2, 再与过量的 Tester cDNA 进行两轮杂交; 然后将杂交产物进行两轮选择性 PCR 扩增, 使 Driver cDNA 中特异表达的片段得到富集, 这样得到的是反向差减杂交 cDNA 二次 PCR 产物。

1.6 PCR 反应体系与反应程序

50 μL PCR 反应体系中含 dNTPs 各 200 μmol/L, 上下游引物各 10 pmol, *Taq* 酶(TaKaRa 公司)1.25U, 模板 2 μL, dd H₂O 补足体积。按程序进行 PCR 扩增, 具体程序如下: 95℃ 预变性 5min, 94℃ 40s, 60℃ 1min, 72℃ 2min, 循环 34 个循环后 72℃ 延伸 5 分钟, 最后进入 4℃ 状态。

1.7 PCR 产物的回收, 克隆和测序

1% 琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物扩增结果, 在紫外灯下切割目标片段, 用天根公司的胶回收试剂盒进行回收纯化, 参照 TaKaRa 公司 pMD-18 T 克隆试剂盒说明克隆目的片段, 筛选阳性克隆送上海生工生物工程技术有限公司用 ABI3730 测序仪进行测序。

1.8 实时荧光定量 PCR 对基因表达模式的研究部分表述调整为:

以 3 尾常温凡纳滨对虾的心脏、肝胰腺、肌肉、胃、肠和眼柄组织及不同低温处理虾(每组 3 尾)的肝胰腺组织总 RNA 随机引物逆转录获得总 cDNA, 作为荧光定量 PCR 模板。根据扩增得到的 *LVANT2* 基因

的cDNA序列,在其保守序列区设计特异引物,上游引物序列为5'-TGGAGGTTCTTCGTTGGT-3',下游引物序列为5'-GATGGTGGTCACGGTCTG-3',预期扩增产物长度为342 bp。根据凡纳滨对虾*Beta-actin*序列设计引物作为内参,上游引物为5'-GGAC TTCGAGCAGGAGATGACCAC-3',下游引物为5'-ACGTCGCACTTCATGATGGAGTTG-3'产物大小为198 bp。实时荧光定量PCR按照RealMast-erMIX (SYBR Green)试剂盒说明书进行操作,并设置以超纯水替代模板的阴性对照,以上述CDNA样品为模板,采取两步PCR法扩增,扩增程序为:95℃ 10s, 95℃ 10s, 58℃ 1min, 40个循环。实验仪器为ABI 7500 fast 定量PCR仪,实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析^[14]。

2 结果

2.1 SSH 文库筛选差异表达基因

将低温处理抑制消减文库PCR中鉴定为单一条带的产物点于尼龙膜上,获得768个基因片段的点阵膜,经变性、中和、固定后与标记的探针进行杂交。将杂交后的信号曝光在X-ray film上(图1)。挑选低温处理和正常温度杂交信号显著差异的克隆测序,获得360 bp的差异基因片段,经过Blast发现该片段与人*ANT2*基因有较高相似性。

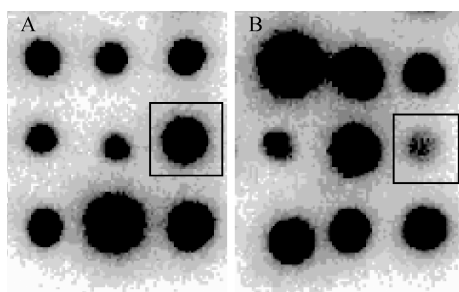


图1 低温处理 cDNA 点阵膜反向 Northern 杂交结果

Fig. 1 Reverse northern blotting of low temperature treatment cDNA array

A. 低温处理 cDNA 探针杂交结果; B. 正常温度 cDNA 探针杂交结果; 方框内表示 *ANT2* 位点

A. Low temperature treatment cDNA probe hybridization; B. No treatment cDNA probe hybridization; The point in the frame indicates *ANT2*

2.2 *LVANT2* 基因的 cDNA 序列分析

从 cDNA 全长文库扩增获得目的片段 1540 bp, 其中开放阅读框 930 bp, 共编码 309 个氨基酸残基, 总相对分子质量为 24.47 kD, 理论等电点为 10.08。开放阅读框各碱基含量分别为 A=20.4%, C=26.0%, G=27.1%, T=26.5%。核苷酸序列的 Genbank 登录号 JN182810。

2.3 *LVANT2* 基因的表达谱分析

LVANT2 基因在肌肉组织中优势表达 以凡纳滨对虾心脏中的表达量为对照,通过荧光定量PCR分析*LVANT2*基因在不同组织中的相对表达量。结果显示,该基因在肌肉中表达量最高,在肠中的表达量最低,差异约达到5倍,表明该基因在肌肉中优势表达(图2)。

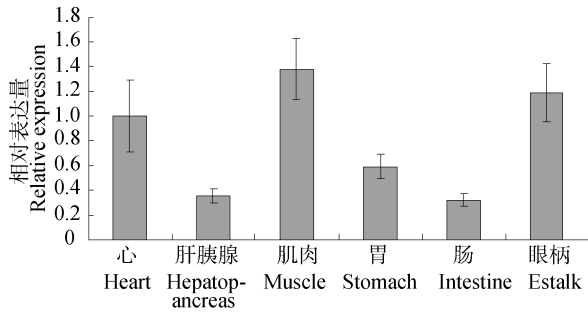
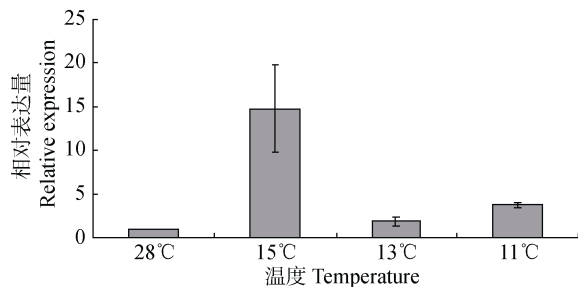
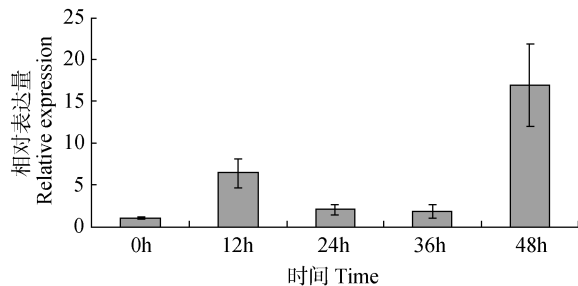
LVANT2 基因低温胁迫时呈上调表达 以28℃常温养殖个体肝胰腺中的表达量为对照,分析*LVANT2*基因在不同低温胁迫36h的相对表达量。结果显示开始低温处理时*LVANT2*基因表达量显著上升,继续降低温度到13℃表达量开始降低,随着温度的持续降低,11℃时表达量又开始回升(图3)。

13℃低温处理48h *LVANT2* 基因的表达量达到最高 以13℃处理0h肝胰腺中的表达量为对照,分析*LVANT2*基因在不同处理时间的相对表达量。结果显示,低温处理12h后表达量显著变化,至处理36h时表达量有所下降,48h表达量最高,达到13℃处理0h表达量的18倍(图4)。

3 讨论

抑制性消减杂交是抑制PCR和消减杂交技术相结合的快速分离基因的方法。它克服了以往方法的局限性,具有简单易行、特异性高、能分离出低丰度差异片段等优点^[15]。但该技术容易产生假阳性,因此需要对获得的基因进行验证。目前,该技术已经在动、植物差异基因的分离上得到广泛应用,研究领域涉及医学、昆虫学、畜牧学、植物学等多个学科,研究方向覆盖了与基因有关的新基因的寻找、致病机理研究、疾病治疗研究、相关基因克隆等各个方面。

构建 cDNA 文库是研究功能基因组学的基本手段之一。cDNA 便于克隆和大量表达,它不像基因组含有内含子而难于表达,因此可以从 cDNA 文库中筛选到所需要的目的基因,并直接用于该基因的表达研究^[16]。传统 cDNA 文库存在克隆片段短等缺点,全长 cDNA 文库则克服该缺点,易于获得完整的基因 cDNA 全长,而且还能通过基因比对获得 mRNA 选择性剪切的信息。通过构建凡纳滨对虾全长 cDNA 文库,易于获得凡纳滨对虾的基因全长,与 RACE 等技术相比费用更省,为全面了解凡纳滨对虾生理过程中的基因表达调控奠定基础。

图 2 *LVANT2* 基因在不同组织中的相对表达分析Fig. 2 Analysis of relative expression of *ANT2* gene in different tissues图 3 *LVANT2* 基因在不同温度下的相对表达分析Fig. 3 Analysis of relative expression of *LVANT2* gene in the different temperature图 4 *LVANT2* 基因在不同时间下的相对表达分析Fig. 4 Analysis of relative expression of *LVANT2* after different cold tolerance time

本研究通过抑制消减杂交和全长 cDNA 文库克隆了凡纳滨对虾的 *ANT2* 基因(*LVANT2*), 并对其在低温胁迫过程中的表达变化进行了研究。我们发现 *LVANT2* 基因在低温诱导时呈上调表达, 在进行不同程度的低温处理时, 发现 15°C 基因表达量最高, 而在 13°C 时下降, 11°C 时该基因又上调表达。这可能是由于温度由 28°C 快速下降到 15°C, 温差变化大, 因此机体与耐寒相关基因高表达以适应低温的影响。温度由 15°C 降到 13°C, 由于温差变化小, 加上 15°C 刺激下基因的过量表达已经能够适应 13°C 的低温, 因此基因表达量反而有所下降。快速降温到 15°C 凡纳滨对虾采食量明显下降, 极少数个体出现

侧卧现象。这也表明温差的大小也是引起基因表达量变化的重要因素。但是随着刺激强度的加大, 机体不能适应更低的温度, 基因又开始上调表达, 刺激强度不断增大就可能造成不可恢复的损伤。结合实验观察结果, 温度降到 13°C 时表现为失衡或侧卧个体增加, 但是经过一段时间适应后基本还能恢复正常状态。随着温度继续下降到 11°C, 所有的凡纳滨对虾都出现侧卧, 并大量死亡, *LVANT2* 基因又开始上调增强, 但是即使未死亡的对虾经回温处理仍无法恢复正常状态, 说明机体耐寒力已经达到极限, 造成细胞组织的不可逆损伤, 最终导致对虾的死亡。13°C 不同处理时间的表达谱显示, *LVANT2* 基因在低温处理 12h 后即开始上调表达, 说明 *LVANT2* 基因可能在低温应激中发挥作用。因此, 我们通过低温差减文库和表达谱分析推断凡纳滨对虾 *LVANT2* 基因具有低温适应方面的潜在功能, 为建立和完善凡纳滨对虾低温适应机理的基因网络体系, 开展分子辅助耐寒选育提供了重要的基因素材。

参考文献:

- [1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, **257**(5072): 967—971
- [2] Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expressing by re-presentational difference analysis of cDNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, **22**: 5640—5648
- [3] Velculescu V E, Zhang L, Vogelstein B. Serial analysis of gene expression[J]. *Science*, 1995, **270**(5235): 484—487
- [4] Lee S, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 1991, **88**: 2825—2829
- [5] 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]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America*, 1996, **93**(12): 6025—6030
- [6] Cai X H, Lu Y S, Wu Z H, et al. Construction of subtracted cDNA library of *litopenaeus vannamei* induced by *vibrio alginolyticus* and analysis of expressed sequence tags [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(1): 157—163 [蔡小辉, 鲁义善, 吴灶和, 等. 溶藻弧菌诱导凡纳滨对虾消减文库的构建及其表达序列标签分析. 水生生物学报, 2010, **34**(1): 157—163]
- [7] Bachem C W, Van Der Hoeven R S, De Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel

- method of RNA fingerprinting based on AFLP, analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant Journal*, 1996, **9**: 745—753
- [8] Santamaria M, Lanave C, Saccone C. The evolution of the adenine nucleotide translocase family [J]. *Gene*, 2004, **333**: 51—59
- [9] Bof M, Brandolin G, Satre M, *et al.* The mitochondrial adenine nucleotide translocator from Dictyostelium discoideum, functional characterization and DNA sequencing [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **259**: 795—800
- [10] Brand M D, Pakay J L, Ocloo A, *et al.* The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content [J]. *Biochemical Journal*, 2005, **392**: 353—362
- [11] Lunardi J, Hurko O, Engel W K. The multiple ADP/ATP translocase genes are differentially expressed during human muscle development [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, **267**: 15267—15270
- [12] Thuswaldner S, Lagerstedt J O, Rojas-Stutz M, *et al.* Identification, expression, and functional analyses of a thylakoid ATP/ADP carrier from Arabidopsis [J]. *Journal of Biochemistry*, 2007, **282**: 8848—8859
- [13] Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, *et al.* Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocases isoforms in humans [J]. *FEBS Letters*, 1997, **414**: 258—262
- [14] Kenneth J L, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, **25**: 402—408
- [15] Ji W, Wright M B, Cai L, *et al.* Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes [J]. *BMC Genomics*, 2002, **20**(3): 12
- [16] Mao X G, Jing R L, Kong X Y, *et al.* Comparison of methods to construct a full length cDNA library [J]. *Heredity*, 2006, **28**(7): 865—873 [毛新国, 景蕊莲, 孔秀英, 等. 几种全长 cDNA 文库构建方法比较. 遗传, 2006, **28**(7): 865—873]

MOLECULAR CLONING OF *LVANT2* GENE AND ITS EXPRESSION PATTERN BY COLD INDUCTION

YIN Qin^{1,2}, CUI Liang¹, PENG Jin-Xia¹, WEI Pin-Yuan¹, XIE Da-Xiang¹, CHEN Xiu-Li¹, WANG Zhi-Wei², LI Kui² and CHEN Xiao-Han¹

(1. Guangxi Key Laboratory of Aquatic Genetic Breeding and Healthy Aquaculture, Guangxi Institute of Fisheries, Nanning 530021, China; 2. Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: To study the molecular mechanism of cold tolerance of *Litopenaeus vannamei*, a 360 bp EST was isolated from suppression subtractive hybridization library of hepatopancreas which treated by low temperature. The 360 bp EST shared highly homology with *ANT2* gene of other species, so we named it *Litopenaeus vannamei ANT2* gene (*LVANT2*). Then we cloned whole cDNA sequence of *PVANT2* from a hepatopancreas cDNA library. The *LVANT2* gene was 1540 bp with a 1011 bp open reading frame encoding a peptide of 309aa. Tissue expression pattern by real-time PCR revealed that *LVANT2* mRNA existed in heart, hepatopancreas, muscle, stomach, intestinal and eyestalk but mainly existed in muscle tissue. Cold induction by different temperatures revealed that *LVANT2* mRNA expression started to increase after 15°C treatment for 36 hours, and then decreased after 13°C treatment for 36 hours, but increased again after 11°C treatment. As for 13°C treatment for different times, the expression pattern changed during the first 12 hours, but the expression with low temperature treatment for 24 hours and 36 hours was almost the same with the room temperature. The low temperature induction expression pattern demonstrated that *LVANT2* may function in cold tolerance of *Litopenaeus vannamei*.

Key words: *LVANT2*; Expression; SSH library; Full-length cDNA library