

大菱鲆肌肉组织中的基因差异表达与体长性状的相关性研究

王慧¹ 解相林² 刘贤忠² 李荣岭¹ 王丹晨³

(1 山东农业大学动物科技学院, 泰安 271018; 2 日照职业技术学院水产系, 日照 276826; 3 山东大学生命科学院, 济南 250100)

摘要: 为了揭示出一些影响鱼类生长发育速度方面的遗传信息, 本文应用 mRNA 差异显示技术, 以同一批受精卵孵化的同池养殖的两组大菱鲆鱼为试验材料, 检测了在相同生长发育条件下两组体长相差悬殊的 3 月龄大菱鲆肌肉组织的基因差异表达。结果: 18 对引物组合共显示出 723 条带, 其中有 527 条带能够重现, 差异显示条带的重现率为 72.89%; 在 527 条稳定的条带中有 21 条为差异带, 其余 506 条为共有带(96.02%)。21 条差异表达条带中有 16 条(3.04%)为阳性差异表达 cDNA 片段。这些差异表达 cDNA 片段的存在, 说明体长差异悬殊的两组大菱鲆之间存在基因表达上的差异。试验结果对于进一步分析各种差异表达基因与大菱鲆的生长性状之间的相关关系奠定了基础; 为深入研究大菱鲆的生长发育性状的分子遗传机制奠定了基础。

关键词: 大菱鲆; 肌肉组织; 差异显示; 差异表达 cDNA

中图分类号: Q344 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2007)04-0552-05

大菱鲆 (*Scophthalmus maximus* L.) 属鲆科

(Bothidae)、菱鲆属 (*Scophthalmus*), 是原产于欧洲北海、波罗的海和地中海沿岸的一种名贵比目鱼。我国自 1992 年开始引进和驯养, 目前, 已成为北方沿海地区的一种重要海水养殖新品种^[1]。大菱鲆肉质鲜美, 内脏团小, 身体肉厚, 可食用部分多, 商品价值高, 市场前景广阔。但是, 近来, 大菱鲆的养殖开始出现种质退化现象, 主要表现为抗病能力下降, 病害增多, 生长速度减缓, 同群个体的生长速度差异极大等现象。因此, 有必要从基因的表达与调控方面对影响大菱鲆生长的遗传因素进行探测。

控制生物性状的基本单位是基因, 同一物种在同一发育时期在生长性状上的差异, 必然与基因的差异表达有关, 而基因在表达上的差异必将反映在 mRNA 水平上。因此, 应用 mRNA 差异显示 (Differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR) 技术研究在相同养殖条件下体长相差较大的两组大菱鲆鱼肌肉组织中的基因差异表达, 可望揭示出一些影响鱼类生长发育速度方面的一些 mRNA 分子水平上的遗传信息^[2]。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集 试验鱼饲养于日照职业技术学院实训基地, 大菱鲆鱼的受精卵于 2005 年 4 月 11 号引进, 成功孵化后, 养殖到 3 月龄时采样, 随机在同一养殖池中捞取各 10 尾体长型(体长超过 4.4cm)个体和体短型(体长短于 3.5cm)个体, 采集肌肉等组织样, 于液氮中提取每一个体的总 RNA, -70℃ 保存。

1.2 嘧核苷酸引物 3' 端锚定引物 3 条: H-T₁₁A: 5'-AAG CTT TTT TTT TTT A-3'; H-T₁₁G: 5'-AAG CTT TTT TTT TTT G-3'; H-T₁₁C: 5'-AAG CTT TTT TTT TTT C-3'。5' 端随机引物 6 条: P1: 5'-TGCGGA AGC TTT GGT ATG-3'; P2: 5'-GCT TCT AGT GAC TCC AGA T-3'; P3: 5'-TCA GAC TCA GCT CTA CCG-3'; P4: 5'-TCA TGA ATC AGC TCT CAC C-3'; P5: 5'-TGC CGA AGC TTT GTA GCA-3'; P6: 5'-GAG TCC TCC ACG TGG AGA-3'。

1.3 总 RNA 的提取、纯化、检测和 RNA 池的构建

按 TRIZOL 试剂盒 (Invitrogen 公司产品) 提供的方法提取总 RNA; 按 Liang 等^[3] 的方法纯化总 RNA; 再经电泳和紫外分光光度计检测后, 分别将两个群体

收稿日期: 2006-01-06 修订日期: 2007-01-18

基金项目: 国家科技部重大攻关项目“食品安全关键技术应用的综合示范”水产子课题(04033810)

作者简介: 王慧(1963—), 女, 汉族, 山东济南人; 博士, 教授; 主要研究方向为动物遗传育种与繁殖。E-mail: yqzeng@sdu.edu.cn

通讯作者: 解相林(1965—), 男, 汉族, 山东诸城人; 硕士, 副教授; 研究方向为动物学。E-mail: xkie@163.com.cn

各 10 个个体的总 RNA 等量均匀混合成浓度为 $0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的两个 RNA 池。

1.4 第一链 cDNA 的合成 反转录反应的总体积为 $40\mu\text{L}$, 其中含有: $0.4\mu\text{g}$ 池 RNA, 50mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 40mmol/L KCl, 7mmol/L MgCl, 20mmol/L dNTP, 200pmol/L 的 $3'$ 端锚定引物。反转录条件为: 65°C , 5min, 打开 mRNA 的二级结构; 至冰上加入 M-MLV 反转录酶 100U (Promega); 37°C , 反转录 1h; 75°C , 5min 灭活反转录酶。

1.5 差异显示(DDRT-PCR) 差异显示反应体系: $V=20\mu\text{L}$ 中含有: $2\mu\text{L}$ cDNA, 10mmol/L Tris-HCl (PH 9.0), 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl, $200\mu\text{mol/L}$ dNTP, 200pmol/L 的 $3'$ 端锚定引物, 200pmol/L 的 $5'$ 端引物, 1U 的 Taq DNA 聚合酶 (Promega)。反应条件: 94°C , 2min; 40°C , 5min, 72°C , 2min; 34 个循环: 94°C , 30s, 60°C , 90s, 72°C , 60s; 72°C , 7min; 4°C 终止反应。反应产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (39:1) 后, 银染法显色。

1.6 差异条带的杂交验证 应用地高辛标记杂交试剂盒 (Roche 公司产品), 对差异表达的 cDNA 条带进行反 Northern 点杂交验证。

1.7 统计分析 电泳图谱在凝胶成像仪上扫描记录, 相同的试验重复两次, 只统计分析那些能够重现的 cDNA 条带。

2 结果

2.1 大菱鲆的体长测量结果

2.2 池 RNA 的质量检测与 RT-PCR 反应体系的优化

分别由 10 个个体的总 RNA 等量均匀混合, 构建成体长个体组和体短个体组的 2 个总 RNA 池。以这两个总 RNA 池为模板, 经过对各种反应条件和影响因素的优化组合, 得到了清晰的 RT-PCR 反应结果, 其中, 第一对引物组合 P1/HT₁₁G 的差异显示结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 两次重复的 RT-PCR 试验检测结果基本相同, 说明本试验所优化建立的 RT-PCR 反应体系可以显示出清晰而稳定的条带。只统计分析那些在两次重复试验中相一致的条带。图 2 中, 472 bp 的条带是一条差异显示条带, 且为体短个体组所特有。

2.3 差异显示条带的统计结果

18 种引物组合在 2 个试验鱼群的池 RNA 中共显示出 723 条 cDNA 条带, 其中有 527 条带能够重

现, 差异显示条带的重现率达到 72.89%。差异显示统计结果列于表 1。

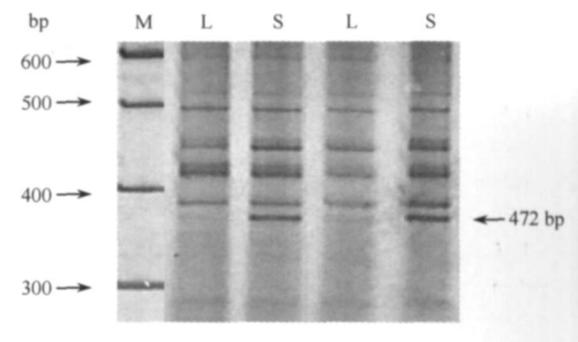


图 1 引物组合 P1/HT₁₁G 的差异显示图谱

Fig. 1 mRNA differential display profiles with primer combination of P1/HT₁₁G

M: 100bp 分子量 ladder; L: 体长组; S: 体短组

M: 100bp molecular ladder; L: RNA pool of large scaled individuals;

S: RNA pool of small scaled individuals

表 1 大菱鲆的体长测量结果

Tab. 1 The long trait of *Scophthalmus maximus* L

样本编号 Sample	体长 Long(cm)	样本编号 Sample	体长 Long(cm)
S1	3.42	L1	4.46
S2	3.41	L2	4.48
S3	3.45	L3	4.47
S4	3.46	L4	4.49
S5	3.46	L5	4.43
S6	3.48	L6	4.51
S7	3.47	L7	4.50
S8	3.46	L8	4.52
S9	3.50	L9	4.51
S10	3.49	L10	4.50

从表 1 可以看出: 18 种引物组合在 2 个试验鱼群的池 RNA 中共显示出 527 条能够重现的条带, 其中有 21 条为差异表达的 cDNA 片段, 但经过对 21 条差异表达的 cDNA 片段进行反 Northern 点杂交验证, 发现有 16 条为阳性差异表达条带, 差异表达阳性条带占总显示条带数的 3.04%。差异显示条带的阳性率为 72.73%, 稍低于差异显示条带的重现率。

2.4 差异显示条带的杂交验证结果

应用反 Northern 点杂交技术对 21 条差异显示条带进行了杂交验证, 结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 第 2 至第 9 条、第 15 至第 19 条差异表达条带均有清晰的杂交信号, 说明均为阳性 cDNA 片段, 而第 1 条和第 11 至第 14 条差异表达片段均出现杂交信号, 表明均为阴性 cDNA 片段。在

表2 18种引物组合的差异显示条带统计结果

Tab. 2 The results of DDRT-PCR by 18 kinds of primer subsets

引物组合 Primer combination	共有带 Identical expressed bands	L 池特有 Bands unique for L pool	S 池特有 Bands unique for S pool	引物组合 Primer combination	共有带 Identical expressed bands	L 池特有 Bands unique for L pool	S 池特有 Bands unique for S pool	合计 Total
P ₁ /G	27	0	1	P ₄ /G	28	0	1	55
P ₇ /C	27	0	0	P ₄ /C	35	0	1	63
P ₁ /A	23	1	0	P ₄ /A	27	0	1	52
P ₂ /G	26	0	2	P ₅ /G	36	1	0	65
P ₂ /C	31	0	1	P ₅ /C	33	0	1	66
P ₂ /A	24	1	0	P ₅ /A	31	0	0	56
P ₃ /G	26	1	0	P ₆ /G	30	0	1	58
P ₃ /C	25	1	0	P ₆ /C	36	0	0	62
P ₃ /A	26	0	1	P ₆ /A	30	1	0	58
差异带合计		4	5			2	5	16
合计 Total	225	4	5		286	2	5	527

所得到的 21 条差异表达 cDNA 片段中, 总共有 16 条得到了阳性杂交信号; 而其余 5 条为假阳性片段。对于 16 条被鉴定为阳性差异表达的 cDNA 片段需要进行进一步的测序分析。

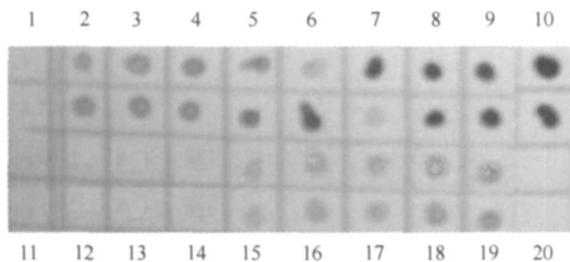


图2 差异显示条带的反 Northern 点杂交验证结果

Fig. 2 Identification results of reverse Northern dot blot of the differential expressed cDNA fragment

第 10 点为阳性对照; 第 20 点为阴性对照。第 2 行和第 4 行分别是第 1 行和第 3 行的重复点样

No. 10 is positive control; No. 20 is negative control. Low 2 is same as the Low 1; So does Low 4 and Low 3

3 讨 论

3.1 关于两组试验鱼之间的体长差异

试验动物即两组试验鱼均来自同一批受精卵, 而且是同池孵化和同池养殖的, 拥有共同的环境效应。3 月龄时随机在同一养殖池中采集体长超过 4.3cm 的 10 个个体作为快速生长组; 而体长小于 3.5cm 的 10 个个体作为慢速生长组, 虽然影响鱼类生长发育的因素很多, 但通过随机取样和分别将 10 个个体作为一个整体即总 RNA 池来进行两组之间的比较, 可以消除来自环境的影响。

试验运用 DDRT-PCR 技术, 检测了 3 月龄时体长差异显著的两组大菱鲆鱼的肌肉组织的总 RNA 池的基因表达。结果在被显示出的 527 条能够重现的 cDNA 条带中, 发现有 16 条为差异表达片段, 差异率为 3.04%, 这些差异表达的基因可能与大菱鲆体长性状的差异有关。在类似的研究中, 胡建广^[7]等采用 DDRT-PCR 技术比较玉米杂种一代及其亲本苗期基因表达产物 mRNA 的差异, 分离并鉴定出一个玉米杂种一代超亲表达的 cDNA, 以该 cDNA 为探针, 从 cDNA 文库中筛选到一个全长的 cDNA 克隆 (ZH01)。

本试验所发现的 16 条差异表达 cDNA 片段的存在, 说明大菱鲆的体长差异与基因的差异表达有关。

3.2 关于假阳性率的克服和反 Northern 点杂交验证

针对 RT-PCR 技术存在着假阳性率高、mRNA 易被降解等缺陷^[2-4], 本研究通过优化各种影响因素、严谨操作、防止 RNA 的降解、延长引物序列、设置重复对照等手段, 大大降低了假阳性率, 使条带的重现率达到 72.89%。这与俞英^[5]、王栋^[6]等的试验结果相类似。

进一步应用反 Northern 点杂交技术, 对 21 条差异显示条带进行了杂交验证。结果有 16 条差异表达的 cDNA 条带为阳性 cDNA 片段。将 5 条点杂交验证为阴性的差异显示条带剔除。差异显示条带的阳性率为 76.19%, 稍高于差异显示条带的重现率 (72.89%)。说明反 Northern 点杂交验证技术是严谨, 可以有效地剔除假阳性条带。

3.3 关于本试验所揭示出的差异表达基因片段

本研究在转录水平所发现的 16 种差异表达基因片段的存在, 进一步说明: 应用 DDRT-PCR 技术和随机取样构建 RNA 池的技术, 可以剔除环境因素的影响, 从而快捷地将在同一养殖条件下的不同个体在生长发育的某一阶段差异表达的基因显示出来^[8], 并可进一步对差异表达的基因加以克隆^[9, 10]、测序和做进一步的深入研究、分析和功能预测。俞英等^[3]、王栋等^[6] 分别应用 RT-PCR 技术在肉鸡和蛋鸡的杂交试验中发现了影响鸡的生长性状的差异表达基因片段, 并通过进一步克隆测序查明了差异表达基因的本质。本试验中所发现的这些差异表达基因必然与大菱鲆的生长性状间存在着某种内在的联系。试验结果对于进一步分析各种差异表达基因与大菱鲆的生长性状之间的相关关系奠定了基础; 为深入研究基因的差异表达程度与大菱鲆的生长发育性状之间的关系和分析影响快速生长的基因奠定了基础。

mRNA 差异显示技术从转录水平入手, 目前取得了十分令人感兴趣的研究结果。同时激发了人们研究基因差异表达的兴趣。随着这一技术的不断完善和运用, 动物遗传育种中的许多问题, 如动物生长发育规律、高产基因的分离克隆和移植、杂种优势等的分子遗传机理等都将被揭示出来^[3-6]。

参考文献:

- [1] Lei Q Q, Ma A J, Liu X F, Men Q. Studies on the development of *Sophthalmus maximus* L. in the embryonic and larval stage [J]. *Oceanol et Limnol Sin*, 2003, **34**(1): 9—18 [雷霖霖, 马爱军, 刘新富, 门强. 大菱鲆胚胎及仔稚幼鱼发育研究. 海洋与湖沼, 2003, **34**(1): 9—18]
- [2] Wang H, Zhang Y, Sun D X, Yu Y. Relationship between differential gene expression patterns in chicken ovary and heterosis in a chicken diallel cross. [J]. *Acta Veterinaria ET Zootecnica Sinica*, 2005, **36**(2): 111—115 [王慧, 张沅, 孙东晓, 俞英. 蛋鸡与肉鸡卵巢组织基因差异表达与产蛋数杂种优势的相关性研究. 畜牧兽医学报, 2005, **36**(2): 111—115]
- [3] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. *Science*, 1992, **257**: 967—971
- [4] Guimaraes M J, Lee F, Zlotnik A, et al. Differential display by PCR: Novel findings and applications [J]. *Nucleic Acid Res*, 1995, **23**: 1832—1833
- [5] Yu Y. Relationship between differential gene expression in chicken heart muscle and liver and heterosis [A]. A dissertation submitted for the degree of doctor from China Agricultural University, 2003 [俞英. 鸡心肌和肝脏组织基因差异表达与杂种优势关系的研究. 中国农业大学博士学位论文, 2003]
- [6] Wang D. Studies on the molecular genetics mechanism of chicken myology traits heterosis by differential display [A]. A dissertation submitted for the degree of doctor from China Agricultural University, 2003 [王栋. 应用 mRNA 差异显示技术研究鸡肉用性状杂种优势分子遗传机理. 中国农业大学博士学位论文, 2003]
- [7] Hu J G, Zhao X S, Yuan Z Q, et al. Cloning of a new gene for coding com translation initiator [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1998, **43**(2): 190—194 [胡建广, 赵相山, 袁自强, 等. 一个编码玉米转译起始因子新基因的克隆. 科学通报, 1998, **43**(2): 190—194]
- [8] Cheng N H, Yang J S, Gao Y P, et al. Alteration of gene expression in maize hybrid F1 and its parents [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1996, **41**: 451—454 [程宁辉, 杨金水, 高燕萍, 等. 玉米杂种一代与亲本基因表达差异的初步研究. 科学通报, 1996, **41**(5): 451—454]
- [9] Kuiper G G, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 5925—5930
- [10] Nishi R, Kidou S, Uchimiya H, et al. Isolation and characterization of a rice cDNA which encodes the eukaryotic initiation factor 4A [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1174**(3): 293—294
- [11] Wu L M, Ni Z F, Sun Q X, et al. Relationship between differential expression patterns of multigene families and heterosis in a wheat diallel crosses [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2001, **28**(3): 256—266 [吴利民, 倪中福, 孙其信, 等. 小麦杂种及其亲本苗期叶片家族基因差异表达及其与杂种优势关系的初步研究. 遗传学报, 2001, **28**(3): 256—266]

STUDIES ON THE DIFFERENCES OF GENE EXPRESSION IN *SCOPHTHALMUS MAXIMUS* L. MUSCLE OF LARGE VERSUS SMALL SCALED INDIVIDUALS

WANG Hui¹, XIE Xiang-Lin², LIU Xian-Zhong², LI Rong-Ling¹ and WANG Dan-Chen³

(1. College of Animal Science & Technology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018; 2. Department of Fishing, Rizhao Occupation Technique College, Rizhao 276826; 3. College of Animal Science, Shandong University, Jinan 250100)

Abstract: In order to understand the molecular basis of fish growth and development, the technique of mRNA differential display was used to analyze the differences in gene expression of muscle tissue in *Scophthalmus maximus* L muscle of large versus small scaled individuals. Only bands that can be repeated in polyacrylamide gel electrophoresis of duplicate PCR products were used for statistic analysis. Our results showed that the differential expressed gene between the 2 fish flocks was very obvious. 18 kinds of primer subsets amplified 527 clear bands of cDNA fragment. In them, the number of differential expressed cDNA fragment is 16 (3.04%); both fish flocks coincident expression 506 (96.02%) bands. The differentially expressed cDNA fragments must be related to the growth and development of fish. The screen of these differentially expressed genes will help us to understand the molecular mechanism in *Scophthalmus maximus* L. growth and development.

Key words: *Scophthalmus maximus* L; Muscle; mRNA Differential Display; Differential expressed cDNA