

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2010.00157

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

蔡小辉 鲁义善 吴灶和 简纪常 王蓓 蔡双虎

(广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨广东省教育厅
水产经济动物病害控制重点实验室, 湛江 524025)

摘要: 利用抑制消减杂交技术构建了溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)诱导的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)血淋巴细胞 cDNA 文库。用 DNAMAN 5.2.2 软件对 560 条高质量的 ESTs 进行聚类, 共获得 239 个 Unigenes。与 GenBank 进行 BLASTx 和 BLASTn 同源比较, 其中 66.9% 为已知功能基因, 33.1% 为未知功能基因, GO 分类将其分为 7 类, 包括能量和基础代谢类相关的基因为第一大类占 36%, 免疫相关基因占 15%, 其他基因占 8%, 信号转导类占 3%, 抗氧化酶和凋亡相关蛋白均为 2%, 核蛋白类占 1%。实验结果表明凡纳滨对虾在溶藻弧菌诱导下可产生一系列特异基因的表达, 通过对文库的分析显示, 基于 PCR 方法建立的 SSH 文库为取得大量免疫相关基因的 ESTs 序列提供了可能。

关键词: 凡纳滨对虾; 溶藻弧菌; 抑制消减杂交(SSH); 表达序列标签(EST)

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)01-0157-07

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)由于生长速度快、适盐度广、耐高温、营养要求低等优点, 是我国南方沿海的主要养殖品种之一。从 1998 年普及养殖以来, 其养殖面积和产量不断扩大, 并于 2001 年掀起了养殖凡纳滨对虾的热潮, 养殖产量在三大对虾(中国对虾、斑节对虾和凡纳滨对虾)中位居首位。但是随着对虾的快速发展, 养殖生态环境日益严峻, 虾病已成为制约我国对虾养殖产业发展的瓶颈, 由细菌感染导致对虾大量死亡的现象很普遍, 特别是由溶藻弧菌引起的红体病, 影响对虾养殖和产量^[1]。传统上治疗和预防虾病主要依赖抗生素、化学药物等, 这些药物的滥用造成了一系列环境问题, 进而造成对虾自身免疫力下降, 严重制约了凡纳滨对虾养殖发展。为了对虾养殖业的健康发展, 科学合理的防止和控制疾病的发生的今后的发展方向, 因此, 在分子水平上研究对虾的免疫防御机制具有重要的意义。

一般认为, 对虾没有获得性免疫, 而是通过先天免疫来抵御病原体的侵入, 这主要依靠吞噬、包

裹和血细胞凝集活性以及血淋巴抗微生物因子^[2]。这种固有的保护性防御在对虾抵御病原感染方面起到了重要作用。近几年分子水平上关于对虾防御机制的研究取得了很大进步, 主要集中在抗微生物活性因子研究, 例如 proPO 激活系统和抗微生物多肽^[3,4]。这将有助于进一步了解对虾和病原间关系。

来源于 cDNA 的每一条表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)代表了文库建立时所采样品特定发育时期和生理状态下一个基因的部分序列^[5]。而基于抑制性 PCR 和消减杂交技术的抑制性消减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)是新的克隆差异基因技术, 在消减杂交过程中能将不同丰度的 cDNA 拷贝数趋于平衡, 保证低丰度 cDNA 得到有效克隆, 杂交后采用的 2 次巢式 PCR 能有效的降低假阳性, 因而在分离差异表达基因研究中得到广泛应用^[6]。本研究结合这两种方法旨在通过构建溶藻弧菌诱导下凡纳滨对虾血淋巴的抑制消减杂交 cDNA 文库, 分析其在诱导下的差异基因表达, 力图寻找凡纳滨对虾抵抗外源微生物感染胁

收稿日期: 2008-05-05, 修订日期: 2009-03-19

基金项目: 广东省科技计划项目(2005B20301008)资助

作者简介: 蔡小辉(1982—), 女, 河北邯郸人; 硕士研究生; 主要从事水产经济动物病害控制及病原生物学研究。Tel: 0759-2362191;

E-mail: caixiaohui66@163.com

通讯作者: 吴灶和, Tel: 0759-2383023; E-mail: wuzh@gdou.edu.cn

迫相关的功能基因, 以期在分子水平上为凡纳滨对虾大规模细菌性疾病检测、控制提供有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物与实验菌株

凡纳滨对虾 100 尾购自湛江海洋渔业局对虾养殖场, 体重约 15 g/只, 规格为 8—10 cm, 水温为 25—28℃, 盐度为 28, 实验室暂养一周以上, 健康存活。溶藻弧菌为本实验室保存菌种。

1.2 攻毒与血淋巴细胞收集

在诱导组凡纳滨对虾体侧肌肉注射 0.1 mL 5×10^7 CFU/mL 溶藻弧菌^[7], 同时对照组注射 0.1 mL 的无菌 0.85% NaCl。在 12h 内连续观察, 待对虾出现个体明显活动异常或个别死亡时抽取血淋巴(ACD 抗凝), 4℃, 1700 r/min 离心 5 min, 收集血淋巴细胞^[8]。

1.3 血淋巴细胞 RNA 制备及 SSH 文库的构建

血淋巴细胞总 RNA 使用 Trizol 法(Invitrogen 公司, 美国)制备, 按说明书进行, 1%琼脂糖电泳检测总 RNA 完整性。PolyATtract[®] mRNA Isolation Systems III Kit(Promega 公司, 美国)纯化 mRNA, 按说明书操作。

使用 PCR-select cDNA subtraction kit(Clonitech, 美国), 进行 cDNA 合成及 SSH 文库构建, 按说明书操作, 以诱导组和对照组构建了正向 SSH 文库。通过比较消减和非消减文库中 β -actin 表达量检测消减效率, PCR 上下游引物分别为 5'-agatgtgtacgacgaaactg-3' 和 5'-tcacgaacgattctcgctcg-3', 扩增条件为 94℃, 30s; 60℃, 30s; 68℃, 2min; 18 个循环, 取 5 μ L PCR 产物在 2.0% 琼脂糖电泳检测。

将消减 PCR 产物使用 QIAquick PCR purification kit(Qiagen 公司, 德国)纯化, 纯化产物与 pMD18-T 载体(TAKARA 公司, 日本)连接, 将连接产物按常规方法转化感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 平铺到含有 Amp⁺、X-gal、IPTG 的 LB 平板上, 挑取单个白色克隆接种于 1.5 mL TSB(2%NaCl)中过夜培养。

1.4 ESTs 测序与同源性分析

随机选择过夜培养的白色克隆, 经 PCR 检测插入片段大小, 引物是 Nest PCR primer1 和 Nest PCR primer 2R, 并经小量培养 600 个阳性菌落寄往北京华大基因研究中心测序。人工校正不正确碱基并去

除载体序列后用 DNAMAN 5.2.2 软件进行聚类。选取 100 bp 以上的 EST 用 NCBI 上 BLASTx 软件和 BLASTn 软件与 GenBank unigene 库中的序列进行同源性比对分析。

2 结 果

2.1 总 RNA 电泳鉴定

提取的诱导组和对照组凡纳滨对虾的血淋巴细胞总 RNA 经紫外分光光度计检测 A_{260}/A_{280} 比值分别为 1.94 和 1.85, 表明纯度较好。电泳图以 18S 条带为主, 未见弥散现象, 说明总 RNA 未发生降解(图 1)。

2.2 SSH 产物的电泳鉴定

正向 SSH 产物为一弥散的 cDNA 群体, 大小集中在 0.3—1.0 kb 范围内。而作为对照的骨骼肌 SSH 产物经两轮 PCR 与 Marker 的带形十分相似, 说明整个 SSH 操作系统良好(图 2)。

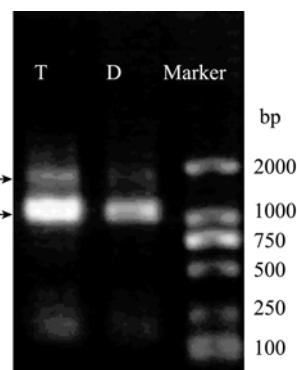


图 1 凡纳滨对虾总 RNA 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of *Litopenaeus vannamei* total RNA
T. 实验组; D. 对照组
T. Experiment; D. Control

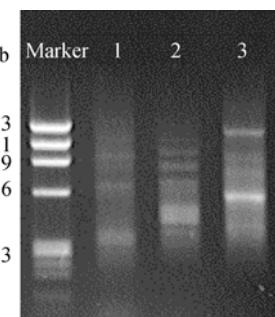


图 2 SSH 产物第二轮 PCR 电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis of second PCR of SSH products
1—3 分别是着骨骼肌 SSH 产物、正向 SSH 产物、未消减 SSH 产物
Lane 1—3 were respectively products of skeletal muscle SSH, products of obverse SSH and products of unsubtraction

2.3 消减效率检测

本实验利用 β -actin 基因对消减前后的双链 cDNA 进行扩增, 以二者之间 β -actin 基因达到同一亮度时循环数的差异作为衡量消减效率高低的标准。从图 3 可见, 未消减的样品在 23 个循环时即有较亮的条带出现, 而消减后的样品在 33 个循环时才有条带, 产生 10 个循环以上的差异说明大量组成型表达的基因已经被有效去除^[9]。

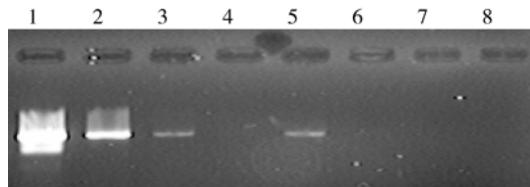


图 3 消减效率检测

Fig. 3 Evaluation of subtraction efficiency

1—4. 消减前样品在扩增 33、28、23、18 个循环时的 PCR 产物; 5—8. 消减后样品在扩增 33、28、23、18 个循环时的 PCR 产物
1—4. PCR products from unsubtracted sample after 33, 28, 23 and 18 cycles of amplification; 5—8. PCR products from subtracted sample after 33, 28, 23 and 18 cycles of amplification

2.4 消减文库的质量检测

转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态中的连接产物, 经蓝白斑筛选得到 2000 个阳性克隆, 表明文库质量较高, 转化效率较好。随机挑选 120 个阳性克隆进行 PCR 扩增, 95% 以上克隆均能扩出产物, 条带多为 500 bp。

2.5 测序结果及分析

随机挑选 600 个阳性克隆经小量扩大培养后测序, 获得 570 个成功插入片段, 测序成功率为 95%, 将所获得的 570 条 ESTs 人工去除低质量序列并经 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 去除载体, 共获得 560 个 Cleaned ESTs, 平均长度为 488 bp, 与 PCR 检测结果相一致。对 Cleaned ESTs 进行聚类, 共聚成 239 个 unigenes (164 个 contigs 和 75 个 singlettons)。经 GenBank 中 nr 数据库进行 Blastx 同源比较, 分析结果见表 1, 其中有 66.9% 为功能已知序列, 33.1% 功能尚未确定。

根据功能将已知基因分为 7 类 (<http://www.geneontology.org/>): 能量和基础代谢类相关基因为第一大类, 占 36%; 免疫相关为第二类, 免疫相关蛋白和酶类分别占 8% 和 7%; 其他基因占 8%; 信号转导类占 3%; 抗氧化酶和凋亡相关蛋白均为 2%;

核蛋白类占 1% (图 4)。

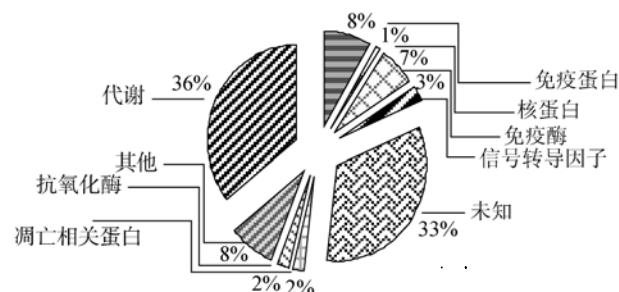


图 4 SSH 文库中 239 个 Unigenes 的功能分布

Fig. 4 Functional distribution of 239 Unigenes in SSH cDNA library

3 讨 论

Diatchenko, et al.^[6] 建立的消减杂交技术 (SSH), 由于具有高度敏感性、操作简便、目的序列富集程度高, 且丰度相对一致等突出优点, 自问世以来受到广泛关注, 已成为有效分离差异表达基因的重要方法, 在对虾上已有应用成功的报道^[10-12]。但要成功运用 SSH 技术首先必须有质量和纯度较好的 RNA 或 mRNA, 保证反转录合成高质量的双链 cDNA。

完整的总 RNA 是获得全长 cDNA 的重要保证。多数真核生物的总 RNA 在正常情况下 28S rRNA 的亮度约为 18S rRNA 的两倍^[13], 而本实验总 RNA 电泳图谱显示 28S rRNA 的亮度低于 18S rRNA, 这与 Wang, et al.^[14] 研究中国对虾肌肉、眼柄、卵巢等组织总 RNA 电泳结果一致。这种现象可能有两种解释: 一是对虾总 RNA 的 28S rRNA 量比 18S rRNA 少; 二是对虾的 RNA 在电泳过程中 28S rRNA 更易于形成二级结构。

在对虾的生物防御基因中, 关于细菌感染诱导表达基因报道很少^[15,16], 目前主要集中在病毒感染后表达基因研究^[2,10,17-19]。由于血细胞是微生物侵入对虾机体免疫反应的主要位点^[14], 具有 DNA 的复制、修复、转导、转录和免疫功能, 所以本实验构建溶藻弧菌诱导的 SSH 文库得到很多免疫相关基因。然而本文库中没有发现在血淋巴主要表达已报道的基因 PEN family、抗脂多糖因子和 crustins。这可能是由于诱导组和对照组中该基因表达量没改变或表达需要一定时间, 同时我们以 5 只虾的血淋巴提取 RNA, 而混合样品不能用以预计群体变化,

表 1 凡纳滨对虾 cDNA 消减文库部分序列分析和同源性比较结果
Tab. 1 Sequenced analysis and identities comparison of *Litopenaeus vannamei* cDNA subtractive library

克隆编号 No.	片段大小 Insert size (bp)	同源性比较 Homolog comparison	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.
311	251	黏蛋白 1 前体(MUC-1) Mucin 1 precursor (MUC-1)	冈比亚按蚊 <i>A. gambiae</i>	XP_138960.1
114	361	小肠黏蛋白 MUC3(片段) Small intestinal mucin MUC3 (Fragment)	人 <i>H. sapiens</i>	O14760
115	212	黏蛋白(片段) Mucin (Fragment)	人 <i>H. sapiens</i>	Q14851
118	548	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	嗜热厌氧产乙醇杆菌 <i>T. ethanolicus</i>	ZP_01454822.1
310	498	热休克蛋白 101 Heat shock protein 101	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	353785
65	437	α 2 巨球蛋白 alpha2-macroglobulin Homolog	日本囊对虾 <i>M. japonicus</i>	BAC99073.1
112	308	富含甘氨酸蛋白 2 Glycine rich protein 2	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	501714663
310	498	ClpB 蛋白酶 ClpB protease	赤桉短粗后胫木虱 <i>G. brimblecombei</i>	AAF78058.1
67	241	甲壳酶 Chitinase	金龟子绿僵菌 <i>M. anisopliae</i>	AAC33265.1
1	400	溶菌酶 Lysozyme	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	AAL23948.1
5	660	胰岛素 Trypsin	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	CAA75311.1
138	392	酰胺转移酶 Amidotransferase	啤酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	S000001587
472	338	NADH 依赖的谷氨酸合成酶 NADH-dependent glutamate synthase	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	BAA97323.1
21	557	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase, 30 kDa subunit	锄足蟾 <i>P. propionicus</i>	YP_902443.1
155	1105	磷酸烯醇丙酮酸 Carboxylkinase Phosphoenolpyruvate carboxylkinase	酿酒酵母 <i>S. cerevisiae</i>	A7A057
112	308	钙调节热稳定蛋白 1 Calcium-regulated heat stable protein 1	小鼠 <i>M. musculus</i>	MGI:1196368
463	235	核糖核酸分解酶 Ribonuclease HII	沙眼衣原体 <i>C. trachomatis</i>	NP_219531.1
3211	81	细胞自溶调节子 Regulator of cell autolysis tengcongensis	耐热厌氧菌 <i>T. anaerobacter</i>	NP_622523.1
173	245	天冬氨酸激酶 α 和 β 亚基 Aspartokinase, alpha and beta subunits	空肠弯曲菌 <i>C. jejuni</i>	Q0PAT5
477	313	推导 ABC 转运系统 ATP 结合蛋白前体 Putative ABC transport system ATP-binding protein precursor	空肠弯曲菌 <i>C. jejuni</i>	Q0P7W6
154	501	细胞色素 C 氧化酶亚型 I Cytochrome c oxidase subunit I	无类囊体蓝藻 <i>G. violaceus</i>	Q7NIM0
154	508	泛醇氧化多肽 I Ubiquinol oxidase polypeptide I	桃蚜专性内共生菌 <i>B. aphidicola</i>	NP_778021.1
13	323	激酶 Activating enzyme	裂殖酵母 <i>S. pombe</i>	SPAC2G11.10c
1110	389	乙酰-CoA 合成酶 Acetyl-CoA synthetase	念珠藻 <i>Nostoc</i> sp.	NP_484812.1
316	294	Vasa-like 蛋白 Vasa-like protein	凡纳滨对虾 <i>L. vannamei</i>	AAV89069.2
337	729	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase	裂殖酵母 <i>S. pombe</i>	SPBP8B7.05c
669	335	磷酸葡萄糖异构酶 Phosphoglucose isomerase	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	FBgn0003074
17	291	丙酮酸脱氢酶[NADP+],线粒体前体 Pyruvate dehydrogenase [NADP+], mitochondrial precursor	纤细眼虫 <i>E. gracilis</i>	Q94IN5
353	390	多(聚)磷酸激酶 Polyphosphate kinase	蓝藻 <i>T. thiebautii</i>	ZP_00074674.1
34	658	ENSANGP00000000700	冈比亚按蚊 <i>A. gambiae</i>	XP_306677.1
1158	358	CG8251-PA	黑腹果蝇 <i>D. melanogaster</i>	NP_523663.1
514	323	AT1G01290.1	拟南芥 <i>A. thaliana</i>	2035276

这可能也是造成一些免疫基因没有在本文库中发现的原因。

本文库中发现了许多与免疫相关的基因(ClPB蛋白酶、热休克蛋白70/101、黏蛋白、溶菌酶、甲壳酶、 α 2巨球蛋白等)。其中ClPB蛋白酶在原核生物中研究比较系统,但在对虾中未见有报道; ClPB蛋白酶具有分子伴侣功能,与细胞的耐热性紧密相关;同时ClPB蛋白酶与HSP70系统也可形成多分子伴侣系统一起调控生物生理活动^[20]。已知分子伴侣不仅在生物大分子的折叠、组装、转运及降解等过程中起协助作用,且参与协助抗原的呈递和遗传物质的复制、转录及构象的确立、细胞周期与凋亡的调控和疾病防御^[21]。黏蛋白基因是免疫相关基因中表达最丰富的(11.4%),已发现黏蛋白在感染病毒的对虾体内和在受到长效磷胁迫的对虾体内都有异常表达的现象^[22,23]。黏蛋白可结合入侵的病原微生物,阻止其与黏膜表面的直接接触,溶菌酶也能随黏蛋白分泌到黏膜表面,增强抗感染能力^[24],说明黏蛋白在对虾防御微生物感染时起到重要作用。许多编码凝集、水解和应急蛋白(溶菌酶、胰岛素、转谷酰胺酶、甲壳酶)ESTs,是体液免疫反应的免疫效应器,这些基因已在斑节对虾^[14]、日本对虾^[15]和鳌虾^[10]中发现。

本文库中发现很多糖酵解酶(丙酮酸脱氢酶、磷酸葡萄糖异构酶和磷酸烯醇丙酮酸碳氧激酶)和氧化呼吸酶(细胞色素c氧化酶、氧化酶多肽和NADH脱氢酶)差异表达,说明溶藻弧菌诱导对虾氧化呼吸作用增强,从而使其通过葡萄糖有氧呼吸产生的ATP增加能量^[25]。既然溶藻弧菌是具有毒力的病原体,这也表明产生能量不仅为了满足机体所需,还可能通过依靠能量的解毒作用来抵御细菌感染^[26]。

信号转导调节因子(信号转导受体分子、天冬氨酸激酶 α 和 β 亚基及推导ABC转运系统ATP结合蛋白前体)在对虾中很多还没有报道。这些基因差异表达说明了一些信号转导途径是一种有关免疫的机制,但还需更进一步研究来了解它们的功能,从而确定最可能的反应免疫机制。几种凋亡相关蛋白也在文库中发现,这说明程序性细胞死亡也可能参与细菌防御。

本文库还获得了母性基因的表达信息,获得了1个与已知的母性基因相似的序列,与果蝇的*vasa*基因相似,在果蝇中该基因为生殖系发育所必需的,

可见其也是凡纳滨对虾生殖系发育必不可少的。Aflalo, et al.^[27]克隆了凡纳滨对虾的*vasa-like*基因的全长并进行表达,发现*vasa-like*基因不仅在生殖细胞中表达,在体细胞中也有表达,*vasa*主要功能是细胞分化,但是它还在细胞再生方面起重要作用^[28]。

参考文献:

- Chen Q, Yan Q P, Ma S. Progress on pathogenicity research of *Vibrio alginolyticus* [J]. *Marine Sciences*, 2006, **30**(8): 83—89 [陈强, 鄭庆枇, 马甡. 溶藻弧菌致病性研究进展. 海洋科学, 2006, **30**(8): 83—89]
- Smith V J, Brown J H, Hauton C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection [J]? *Fish Shellfish Immunology*, 2003, **15**(1): 71—90
- Sritunyalucksana K, Cerenius L, Söderhäll K. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1999, **23**(3): 179—186
- Destoumieux D, Munoz M, Cosseau C, et al. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. *Cell Sci*, 2000, **113**(3): 461—469
- Gu K Y, Yuan Z Q, Zhai H Q. Advances in the study on the suppression subtractive hybridization [J]. *Biotechnology Inform*, 1999, **15**(2): 13—16
- 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**(12): 6025—6030
- Cao J X, Jian J C, Wu Z H. Effect of *Vibrio alginolyticus* vaccine on *Penaeus vannamei* immunity [J]. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 2004, **24**(6): 11—17 [曹剑香, 简纪常, 吴灶和. 溶藻弧菌疫苗对凡纳滨对虾免疫功能的影响. 湛江海洋大学学报, 2004, **24**(6): 11—17]
- Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, et al. Identification of immune-related genes in hemocytes of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Marine Biotechnology*, 2002, **4**(5): 487—494
- Zhou X X, Huang R, Guo Q L. Construction of a subtractive cDNA library from the internal organs of *Trion YX sinensis* experimentally infected by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 509—515 [周秀霞, 黄容, 郭琼林. 嗜水气单胞菌感染的中华鳌主要器官差减cDNA文库的构建. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 509—515]
- Zeng Y, Lu C P. Detection of immune associated genes and analysis of a new serine proteinase inhibitor gene in crayfish *Procambarus clarkia* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, **11**(4): 318—324 [曾勇, 陆承平. 鳌虾免疫相关基因的检出及丝氨酸蛋白酶抑制物基因分析. 中国水

产科学, 2004, **11**(4): 318—324]

[11] Wang Y L, Jia X W, Zou Z H, et al. Detection of differential expression genes of testis and ovary in *Marsupenaeus japonicus* using multiplex PCR technique [J]. *Science Technology and Engineering*, 2004, **4**(5): 1671—1815 [王艺磊, 贾锡伟, 邹志华, 等. 多重 PCR 技术分析日本对虾 *Marsupenaeus japonicus* 精巢和卵巢差异表达基因. 科学技术与工程, 2004, **4**(5): 1671—1815]

[12] Qiu G F, Yamano K, Unuma T. Cathepsin C transcripts are differentially expressed in the final stages of oocyte maturation in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and molecular biology*, 2005, **140**(2): 171—181

[13] Wang Z Z, Jiao C Z, Zhang X J, et al. Molecular cloning and sequence analysis of full length cDNA encoding molt-inhibiting hormone from *Fennopenaeus chinensis* [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2003, **30**(2): 128—134 [王在照, 焦传珍, 张晓军, 等. 中国对虾蜕皮抑制激素全长 cDNA 的克隆及序列分析. 遗传学报, 2003, **30**(2): 128—134]

[14] Wang B, Li F H, Dong B, et al. Discovery of the genes in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection in *Fennopenaeus chinensis* through cDNA microarray [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, **8**(5): 491—500

[15] Burge E J, Madigan D J, Burnett L E, et al. Lysozyme gene expression by hemocytes of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after injection with *Vibrio* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, **22**(4): 327—339

[16] Somboonwiwat K, Supungul P, Rimphanitchayakit V, et al. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi*-challenged shrimp *Penaeus monodon* [J]. *Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, **39**(1): 26—36

[17] He N H, Qin Q W, Xu X. Differential profile of genes expressed in hemocytes of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization [J]. *Antiviral Research*, 2005, **66**(1): 39—45

[18] Pan D, He N H, Yang Z Y, et al. Differential gene expression profile in hepatopancreas of WSSV-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by suppression subtractive hybridization [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, **29**(2): 103—112

[19] Robalino J, Almeida J S, McKillen D, et al. Insights into the immune transcriptome of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: tissue-specific expression profiles and transcriptomic responses to immune challenge [J]. *Physiological Genomics*, 2007, **29**(1): 44—56

[20] Yang J Y, Sun A Q, Liu J. The structure and function of heat shock protein ClpB [J]. *Plant Physiology Communications*, 2006, **42**(2): 326—340 [杨金莹, 孙爱清, 刘箭. 热激蛋白 ClpB 的结构和功能. 植物生理学通讯, 2006, **42**(2): 326—340]

[21] Nie Z Q, Wu Y G, Meng J Z. The function and application of molecular chaperone [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006, **18**(1): 84—89 [聂忠清, 吴永刚, 蒙建洲. 分子伴侣的功能和应用. 生命科学, 2006, **18**(1): 84—89]

[22] Ru S G, Li Y Q, Jiang M, et al. Study on the spheroid virus of *Penaeus chinensis* [J]. *Journal of Ocean University of Qingdao*, 1997, **27**(1): 45—50 [汝少国, 李永琪, 姜明, 等. 中国对虾球形病毒的初步研究. 青岛海洋大学学报, 1997, **27**(1): 45—50]

[23] Liu X Y, Sheng X Z, Jiang M. Studies of midgut cecum of *Penaeus chinensis* I. Structures and functions of tissues and cells of anterior midgut oecum [J]. *Marine Fisheries Research*, 1998, **19**(1): 1—7 [刘晓云, 绳秀珍, 姜明. 中国对虾中肠盲囊的研究 I. 中肠前盲囊的组织细胞结构和功能. 海洋水产研究, 1998, **19**(1): 1—7]

[24] Allen A, Hutton D A, Pearson J P. The MUC2 gene product: a human intestinal mucin [J]. *Biochemistry & Cell Biology*, 1998, **30**(7): 797—801

[25] Wang H C, Wang H C, Leu J H. Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2007, **31**(7): 672—686

[26] Emmons S, Phan H, Calley J, et al. Cappuccino, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus [J]. *Genes Dev*, 1995, **9**(20): 2482—2494

[27] Aflalo E D, Bakhrat A, Raviv S, et al. Characterization of a Vasa-like gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis [J]. *Molecular Reproduction and Development*, 2006, **74**(2): 172—177

[28] eydoux G, Strome S. Launching the germline in *Caenorhabditis elegans*: regulation of gene expression in early germ cells [J]. *Development*, 1999, **126**(15): 3275—3283

CONSTRUCTION OF SUBSTRACTED cDNA LIBRARY OF *LITOPENAEUS VANNAMEI* INDUCED BY *VIBRIO ALGINOLYTICUS* AND ANALYSIS OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS

CAI Xiao-Hui, LU Yi-Shan, WU Zao-He, JIAN Ji-Chang, WANG Bei and CAI Shuang-Hu

(Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic animals & Education Department
Key Laboratory of Control for Disease of Aquatic Economic Animals, Fisheries College of Guangdong Ocean University,
Zhanjiang 524025, China)

Abstract: *Vibrio alginolyticus* is one of the main causative agents resulting in serious infectious diseases of *Litopenaeus vannamei* and other animals. Suppression subtractive hybridization (SSH) is a new and highly effective method for analysing differentially expressed or tissue-specific cDNA probes and libraries. It is applicable to diagnosis of disease, development, tissue specificity, or other differential expressing. Based on the user manual of Clontech PCR-SelectTM cDNA subtraction kit, a suppression subtraction cDNA libraries of *Litopenaeus vannamei* were made by a PCR method. Experimental shrimp were injected with 5×10^7 CFU live *Vibrio alginolyticus* and the control shrimp were injected with sterilized normal saline. The mRNA from hemocytes of normal shrimp and vibrio-challenging shrimp must be isolated firstly. After mRNA was reverse transcribed into double strand cDNA, the two kinds of ds cDNA were denominated with Driver cDNA (normal shrimp) and Tester cDNA (vibrio challenging shrimp) separately. Then they were digested with *Rsa* I at the same time but only Tester ds cDNA were diluted and ligated to adaptor 1 and adaptor 2R in separate ligation reactions in the same total volume. Then an excess of driver cDNA was added to each tester cDNA for the first round of hybridization to enrich for differentially expressed sequences. Secondly, the two samples from the first hybridization were mixed together and freshly denatured driver DNA was added to each tester cDNA for differentially expressed sequences. Only the remaining normalized and subtracted ss tester cDNA were able to reassociate and form newly hybrids with different adaptors at their 5'-ends in the second hybridization. The new hybrids were preferentially amplified by PCR with a pair of primers, nested PCR primer 1 and nested PCR primer 2R. *Litopenaeus vannamei* β -actin gene was used as internal control to estimate the efficiency of subtractive successfully constructed. In this library, β -actin was subtracted significantly above 10 cycles, suggesting that the subtractive cDNA library was successfully constructed. The subtracted products were cloned into the pMD-T 18 Vector. Then the recombinated plasmid was transformed into DH5 α . PCR analysis showed that the inserts were 488bp equally in length. The subtracted cDNA library including 2000 clones and picked 600 clones to sequence randomly. The obtained 560 ESTs were assembled to 239 Unigenes (164 contigs and 75 singletons) with DNAMAN 5.2.2 software. Compared with sequences in unigene database of GeneBank with BLASTx and BLASTn algorithm, 159 ESTs of them had comparatively clear results and the percent of them in acquired ESTs was 66.9%. The sequences of these ESTs were subjected to GO annotation. According to their physiological function, they could be subdivided into 7 categories, 36% were metabolism genes; 15% were immune-related genes; 8% were others genes; 3% were regulation and signal transaction factors; 2% were apoptotic-related proteins and antioxidant enzyme; 1% were ribosomal proteins. The result showed that *Litopenaeus vannamei*, induced by *Vibrio alginolyticus*, could express serials of special genes. Analysis of the libraries indicates the PCR based suppression subtraction cDNA libraries is feasible used to discover the immune gene in shrimp.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; *Vibrio alginolyticus*; Suppression subtractive hybridization (SSH); Expressed sequence tag (EST)