

雏鸭肝炎病毒侵染下肝脏消减 cDNA 文库的构建及差异基因筛选

李 秀¹, 徐 琪¹, 张 扬¹, 毕瑜林¹, 赵荣雪¹, 陈昌义², 段修军³, 陈国宏^{1*}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 江西农业大学动物科学技术学院, 南昌 330045; 3. 江苏畜牧兽医职业技术学院, 泰州 225300)

摘要: 本研究通过构建雏鸭肝脏消减 cDNA 文库, 旨在筛选并鉴定与雏鸭病毒性肝炎相关的基因, 对相关基因进行功能聚类分析进而探究其作用机理。利用抑制性消减杂交 (Suppression subtraction hybridization, SSH) 技术构建 3 日龄健康全同胞金定鸭人工感染雏鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV) 与同期注射等量生理盐水差异表达基因的 SSH-cDNA 文库。对其中 563 个阳性克隆进行测序, 共获得 299 条差异表达序列标签 (Expressed sequence tags, ESTs)。去除冗余的 cDNA 序列载体并聚类拼接后, 进行核酸和蛋白质同源性的比较和功能聚类分析。结果表明: 有 70 个不同的基因与 ESTs 具有高度的同源性 (E 值 $< e^{-10}$, 匹配长度 > 150 bp, 匹配度 $> 80\%$), 且多数基因与细胞组分合成、信号转导以及病理状态下的生物学调控过程相关。I 型雏鸭病毒性肝炎的发生和发展是多基因多步骤的复杂过程, 该结果为深入研究雏鸭肝炎病的分子调控机制提供基础。

关键词: 雏鸭; 雏鸭肝炎病毒; 抑制性消减杂交; 表达序列标签

中图分类号: S834; S831.2

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)02-0211-09

Construction of a Suppression Subtractive Hybridization cDNA Library to Screen Differentially Expressed Genes from Duck Liver Infected Duck Hepatitis Virus

LI Xiu¹, XU Qi¹, ZHANG Yang¹, BI Yu-lin¹, ZHAO Rong-xue¹,
CHEN Chang-yi², DUAN Xiu-jun³, CHEN Guo-hong^{1*}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 3. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China)

Abstract: This research aimed to detect and identify genes associated with duck viral hepatitis (DVH) by construction of suppression subtractive cDNA library, and explore their mechanism by function cluster analysis. Using suppression subtraction hybridization (SSH), a different expression SSH-cDNA library of 3-day-old and full-sib ducklings infected artificially by DHV was constructed and the same day-age ducklings were injected with the same quantity of saline. Of which 563 clones were sequenced, and 299 differentially expressed sequence tags (ESTs) were obtained. After dislodging the redundant cDNA sequence and clustering splicing, the software BLAST in NCBI of GenBank was used to do the nucleic acid and protein homology comparisons and functional analysis. The results showed that 70 different genes had highly homologous with ESTs (E value $< e^{-10}$, match length > 150 bp, match rate $> 80\%$), most of which were related to the synthesis of cell components, signal transduction and the biological control process of pathological conditions. The occurrence and development of DVH was a complex multistep process involving

收稿日期: 2011-03-23

基金项目: 江苏省属高校自然科学基金基础研究面上项目 (07KJB230138); 扬州大学科技创新培育基金项目 (2010CXJ056)

作者简介: 李 秀 (1986-), 女, 江苏宿迁人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: IcebergXiu@163.com

* 通讯作者: 陈国宏, E-mail: ghchen@yzu.edu.cn

multiple genes. The results provide a basis for further study of the molecular mechanism of DVH.

Key words: ducklings; DHV; SSH; ESTs

我国是鸭饲养和消费大国,但是随着养殖量的日益增加疾病的发病率也逐年增高,并造成巨大经济损失^[1-2]。鸭病毒性肝炎(Duckling viral hepatitis, DVH)简称鸭肝炎(DH),是由雏鸭肝炎病毒引起的一种传播迅速、发病急、传染性强、致死率高的传染病,主要侵害3周龄内的雏鸭,雏鸭的发病率和死亡率都很高。已有研究资料提示,该疾病是由许多易感基因和环境因素相互作用的结果^[3-4],因此筛选和鉴定鸭肝炎相关基因,对了解该病的病因和发病机制具有重要作用。

本研究以全同胞公金定雏鸭肝脏组织作为试验材料,用抑制性消减杂交技术构建了患病鸭与健康鸭肝脏组织差异表达基因的cDNA文库,筛选差异表达基因,为从分子水平上研究雏鸭肝炎病的发生机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选用一对无母源抗体,未经任何免疫饲养的国家级水禽种质资源基因库(泰州)的健康成年金定鸭。隔离饲养30 d后,收集12枚种蛋,集中孵化,出壳后集中精心饲养至3日龄,选取体质量相当,精神状态较好的8只雏鸭,随机分为2组,即试验组和对照组。试验组通过腿肌注射0.4 mL雏鸭肝炎病毒($DELD_{50} = 10^{-7}$),对照组注射等量的生理盐水。隔离饲养,观察发病情况,在接种组出现典型症状后,采集试验组和对照组肝脏组织,于液氮中速冻, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。I型雏鸭肝炎病毒由扬州大学兽医学院彭大新教授馈赠。

1.2 方法

1.2.1 抑制性消减杂交cDNA文库的构建及筛选

采用Trizol总RNA提取试剂盒(Invitrogen, 北京)提取试验组和对照组肝脏组织的总RNA。参照Oligotex mRNA Midi Kit说明书分离纯化mRNA。依照Clontech公司的PCR-Select cDNA Subtraction Kit分别以健康鸭肝脏组织cDNA为Tester,患病鸭肝脏组织cDNA为Driver(正向库)和以健康鸭肝脏组织cDNA为Driver,患病鸭肝脏组织cDNA为Tester(反向库)进行2次抑制性消减杂交试验,富

集差异表达的基因。浓缩、纯化2次PCR产物后参照D101A说明书与pMD18-T载体连接,转化大肠杆菌感受态细胞DH5 α ,涂于含有X-gal/IPTG的LB培养基上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜培养,正、反向库分别随机挑取384个白色克隆,形成相应的cDNA文库。

1.2.2 PCR和斑点杂交鉴定差减文库 768个白斑克隆于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $250\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇菌过夜后按每管加buffer $2.5\text{ }\mu\text{L}$, dNTP($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.5\text{ }\mu\text{L}$, Nest primer 1,2($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $1\text{ }\mu\text{L}$, Taq酶 $0.25\text{ }\mu\text{L}$ 加水补至 $24.0\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 35个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min; $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。琼脂糖凝胶检测PCR扩增效果。

取 $0.6\text{ }\mu\text{L}$ 鉴定成功插入克隆片段的PCR产物点于尼龙膜(INYC00010, Millipore)上,二轮差减PCR产物用Rsa I酶切纯化后为探针,参照Strip-EZ DNA Kit说明书进行探针标记及纯化。纯化后参照Ultrascreen说明书操作,膜在 $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预杂交液中预杂交3 h,探针水浴,冰浴后加入杂交液中,从杂交炉中取出杂交管打开瓶盖移出预杂交液,立即加入杂交液盖紧瓶盖放入杂交炉内杂交过夜(14 h),洗膜检测信号强度,正向差减文库产物点膜的反应中正向差减探针杂交信号同反向差减探针杂交信号比值大于2的为阳性;反向差减文库产物点膜的反应中,正向差减探针杂交信号同反向差减探针杂交信号比值小于0.5的为阳性。

1.2.3 消减cDNA文库的阳性克隆测序及序列分析

经鉴定的2个消减cDNA文库中,所有阳性克隆(563个)均送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序,所获得的序列利用DNASTar中的MegAlign进行多重比对,去除载体序列、重复和低质量序列以及巢式PCR引物序列,得到前处理后的序列。前处理后的序列均在NCBI上(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>),与原鸡序列进行BLASTn和BLASTx比对。当与数据库中的基因超过150 bp匹配上,且E值小于 e^{-10} 时,视序列与该基因是同源的。基于BLAST比对出来的结果,利用Uniprot数据库和在线软件GO和KEGG对筛选的基因进行功能分类。

2 结 果

2.1 临床表现及病理变化

观察发现, 试验期内对照组饮食饮水正常, 精神状况良好, 未见死亡, 对该组鸭进行解剖, 各器官均表现正常。

试验组攻毒后 12~48 h 内, 出现精神状态不佳, 运动量比对照组少, 嗜眠, 缩颈, 喙抵地面, 两肢软弱; 食欲减退, 饮水量减少, 粪便稀薄, 呈黄绿色或黄白色; 有少数病例出现头颈歪斜, 不断鸣叫, 时而转圈, 时而后退; 眼和鼻孔有浆液性或黏液性分泌物, 两眼周围羽毛粘连脱落, 咳嗽、喷嚏、甩头、呼吸困难; 临死前摇头、点头、背脖, 两腿伸直, 呈角弓反张状态, 出现全身痉挛性抽搐, 并很快死亡。剖检后发现, 肝脏肿大, 外观呈土黄色或黄褐色, 较对照质地松软易碎, 表面出现血点或血斑; 肾脏充血、肿胀; 脾脏肿大 1~2 倍, 外观呈花斑样; 胆囊肿大, 内充满墨绿色的胆汁; 心肌柔软, 颜色较淡, 外观如煮肉样, 明显受损, 结果见图 1。



图 1 感染 I 型 DHV 后出现的典型症状

Fig. 1 Typical symptoms of duck infected by duck hepatitis virus

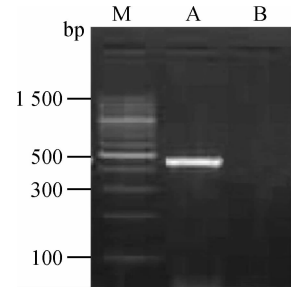
2.2 RT-PCR 法检测鸭肝炎病毒

以病毒基因组序列为基础设计引物 P1: 5'-ACAATGACCCAGCCTTAG-3', P2: 5'-CCACTGTATCTTCCCTTC-3'^[5]。试验组得到片段长度为 440 bp 的目的条带, 对照组表现为阴性, 结果见图 2。

2.3 肝脏组织总 RNA 的抽提和 mRNA 的分离纯化

对试验组(A组)和对照组(B组)肝脏组织总 RNA 进行抽提, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S 条带清晰, 且亮度比值约为 1:1, 结果见图 3。参照 Oligotex mRNA Midi Kit 说明书分离纯化 mRNA, 整个泳道呈现均匀的弥散状(图 3), 说明总 RNA 和 mRNA 完整性好, 基本无降解, 并且基本无蛋白和其它杂质污染, 符合 SSH 建库的质量要

求, 可用于后续研究。

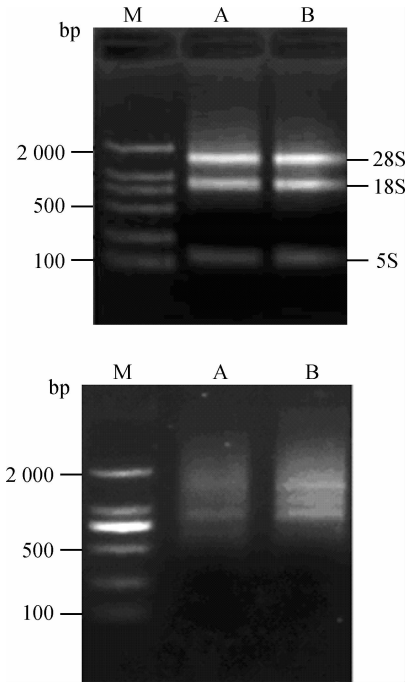


A. 试验组鸭肝脏; B. 对照组鸭肝脏; M. DNA 相对分子质量标准 DL1500

A. The duck liver infected by DHV; B. The healthy duck liver; M. DL1500 marker

图 2 RT-PCR 法检测雏鸭肝炎病毒

Fig. 2 Detecting DHV by RT-PCR



A. 试验组鸭肝脏总 RNA 和 mRNA; B. 对照组鸭肝脏总 RNA 和 mRNA(下图为 mRNA); M. DNA 相对分子质量标准 DL2000。下同

A. Total RNA and mRNA in liver infected DHV; B. Total RNA and mRNA in normal duck liver(the below is mRNA); M. DL2000 marker. The same as follows

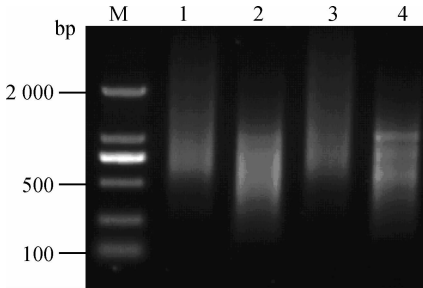
图 3 鸭肝脏总 RNA 和 mRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 1% agarose gel electrophoresis of total RNA and mRNA in duck liver

2.4 感染 DHV 的雏鸭肝脏组织消减杂交 cDNA 文库的构建

经过消减杂交 cDNA 的 PCR 产物中在 150~

500 bp 之间出现了许多经过富集的特异条带(图 4 和图 5),且与未经消减的 cDNA 为模板的 2 次 PCR 产物相比,电泳条带都明显不同。可初步断定本次试验富集差异基因的效果良好。结果也初步显示成功建立了包含 DHV 感染雏鸭过程中差异表达基因的正、反差减 cDNA 文库。



1,3. 分别是以反向和正向文库未经消减的 cDNA 为模板; 2,4. 分别以反向和正向文库经过消减的 cDNA 为模板。下图同

1,3. PCR products using DTF and DTR unsubtractive cDNA as template; 2,4. PCR products using DTF and DTR subtractive cDNA as template. The same below

图 4 以消减和未消减的 cDNA 为模板的第一轮 PCR 反应结果

Fig. 4 The 1st PCR products of both subtracted and unsubtracted cDNA

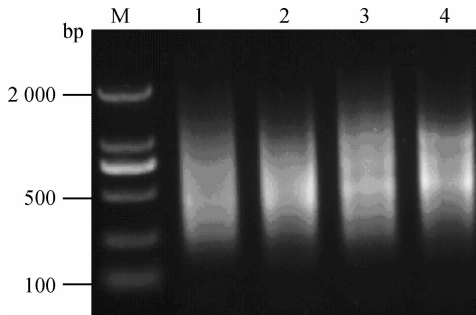


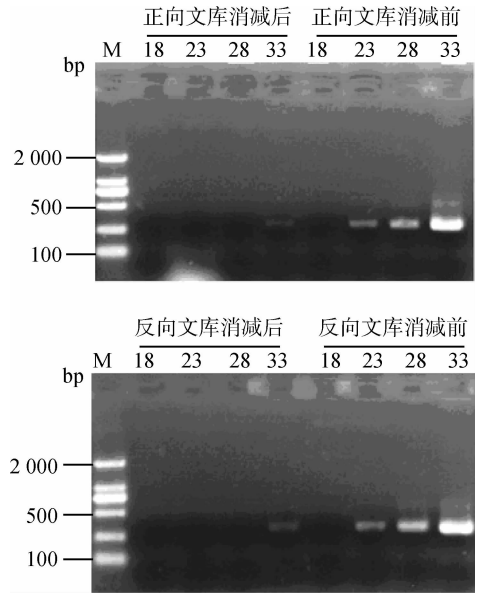
图 5 以消减和未消减 cDNA 为模板的第二轮 PCR 反应结果

Fig. 5 The 2nd PCR products of both subtracted and unsubtracted cDNA

2.5 差减 cDNA 文库的差减效率检测

以鸭的管家基因 $\beta actin$ 序列为基础设计引物扩增 $\beta actin$ 基因来检测差异表达基因在差减 cDNA 文库中的差减效率(图 6)。PCR 扩增结果显示,以未经过差减的 cDNA 为模板,PCR 扩增 23 个循环后,即可扩增出较强的 $\beta actin$ 基因条带,而经过差减杂交的 cDNA 中直到 33 个循环后才扩增出较弱的条带。因此差减杂交将 $\beta actin$ 基因减弱了至少 $2^{(33-23)} = 2^{10}$ 倍,由此可说明差减杂交将某些特

有的差异表达基因同样富集了 2^{10} 倍。



图上的数字表示对应的 PCR 循环数

The figures show that the corresponding PCR cycle number

图 6 以 $\beta actin$ 为指标检测 2 个文库的消减效率

Fig. 6 Subtractive efficiency test of the two subtractive cDNA libraries

2.6 抑制消减 cDNA 文库的 PCR 筛选与斑点杂交

在构建的正、反向消减 cDNA 文库中共挑取了 768 个 cDNA 克隆,将 2 个文库中所有克隆进行 PCR 扩增,电泳结果显示插入片段大小主要分布在 150~500 bp 之间(图 7 和图 8)。将 PCR 产物纯化后,剔除含有污染质粒和空质粒的克隆,从 2 个文库中共获得有效克隆 563 个。对 PCR 筛选的有效克隆基因进一步进行斑点杂交鉴定(图 9),结果显示,正向消减 cDNA 文库内共筛选出 222 个阳性克隆,反向消减 cDNA 文库内共筛选出 77 个阳性克隆,阳性率为 53.11%。

2.7 阳性克隆测序和序列分析

对阳性克隆测序结果用 BLASTn 和 BLASTx 软件做同源性分析,对同一基因的 EST 进行拼接比对,结果显示,299 条 ESTs 中 168 条对应 NCBI 中 70 个已知基因(E 值 $< e^{-10}$, 匹配长度 > 150 bp, 匹配度 $> 80\%$),其中上调基因有 52 个,下调基因 18 个; 131 条 ESTs 未找到同源的基因序列可能对应于一些新基因或者未知基因,详见表 1 和表 2。将匹配序列进一步在 Uniprot 数据库(<http://www.uniprot.org/>)和 Gene Ontology 分类体系(www.geneontology.org)进行比对,获得对应的功能注

释, 结果如图 10。可见, 筛选到的基因主要通过特定的结合过程来调节个体的生命活动, 通过影响 DNA 正常复制, 脂肪酸、药物、毒物、吡哆醛磷酸盐

等异常代谢, 重金属异常整合等, 导致动物机体出现病理现象甚至死亡。

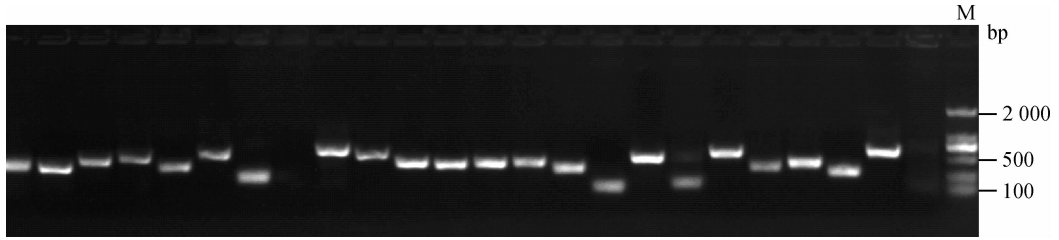


图 7 PCR 鉴定正向消减文库的插入片段
Fig. 7 PCR products of single clones from DTF library

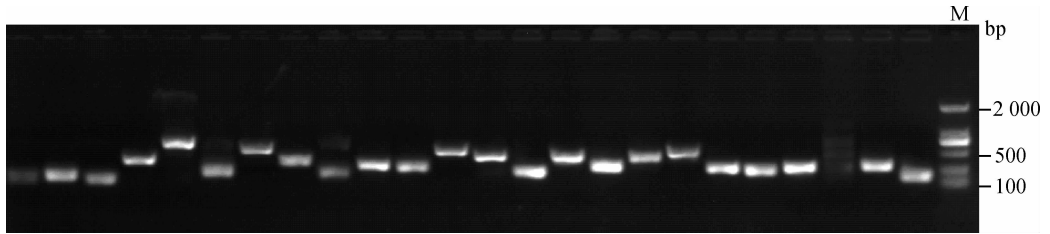


图 8 PCR 鉴定反向消减文库的插入片段
Fig. 8 PCR products of single clones from DTR library

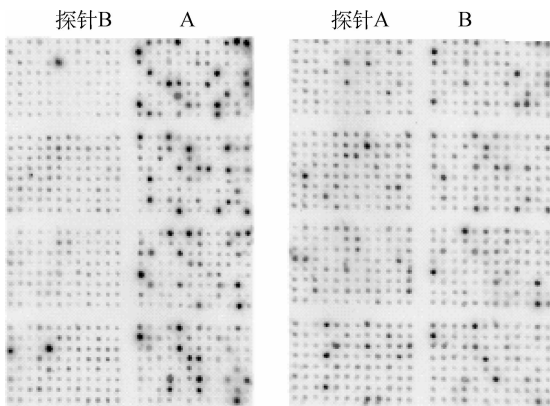


图 9 正反向文库斑点杂交结果
Fig. 9 Dot blot results of two library

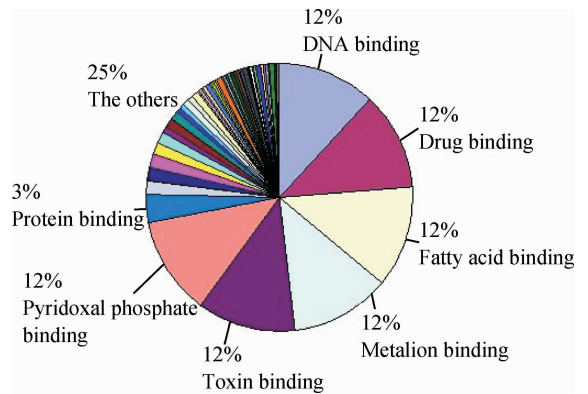


图 10 差异表达 EST 聚类分析结果
Fig. 10 Functional categories analysis of differentially expressed tags in duck liver infected DHV

表 1 SSH 技术筛选人工感染 DHV 后在病鸭肝脏的上调表达基因

Table 1 List of up-regulated genes identified with SSH technology in duck liver infected DHV

Gene identification	GENE ID	Best match accession No.	Identity	E-value
Spem homolog, transcriptional regulator (SPEN)	419460	XM-417618.2	248/260	3E-114
Similar to cyclin L ania-6a (CCNL1)	425024	XM-422826.2	280/335	4E-79
Collagen, type IV, alpha 1 (COL4A1)	395530	NM-001162399.1	248/277	1E-56
Similar to ST3A1 (LOC421740)	421740	XM-419772.2	668/752	5E-47
Similar to Vacuolar protein sorting 36 (VPS36)	418883	XM-417077.2	298/323	7E-127

Gene identification	GENE ID	Best match accession No.	Identity	<i>E</i> -value
Methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase (MTHFD1)	423508	NM-001039303.1	406/455	7E-158
Poly(A) binding protein, cytoplasmic 1 (PABPC1)	430997	NM-001031597.1	197/210	1E-83
Cathepsin C (CTSC)	419014	XM-417207.2	284/308	4E-120
Similar to ribosomal protein S15, transcript variant 2 (RPS15A)	427675	XM-425249.2	210/212	1E-48
Kinesin heavy chain member 2A (KIF2A)	427156	NM-001039312.1	210/245	6E-62
SERPINE1 mRNA binding protein 1 (SERBP1)	424706	NM-001031293.1	132/162	3E-28
Similar to Eukaryotic translation elongation factor 1 delta (EEF1D)	769368	XM-001232627.1	299/335	2E-114
Similar to bullous pemphigoid antigen dystonin (DST)	421884	XM-419901.2	677/734	2E-110
Golgi-associated microtubule-binding protein (TRIP11)	423414	XM-421324.2	733/802	8E-31
Phosphoserine phosphatase (PSPH)	417540	BX934763.2	159/169	8E-67
SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like (SH3BGRL)	422277	NM-001012574.1	435/484	2E-174
Legumain (LGMN)	423418	XM-421328.2	292/358	4E-71
Chondroitin polymerizing factor 2 (CHPF2)	426039	XM-423717.2	246/264	2E-106
Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform (PPP2CA)	416318	NM-001006152.1	383/391	3E-56
Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1)	423463	NM-001109785.1	421/460	1E-180
Solute carrier family 25 member 6 (SLC25A6)	374072	NM-204231.2	447/487	6E-104
Similar to Vesicle-associated membrane protein, associated protein (LOC426378)	426378	XM-424031.2	242/288	3E-71
Fibrinogen alpha chain (FGA)	396307	XM-20803.1	268/273	3E-21
WD repeat and SOCS box-containing 1 (WSB1)	395685	NM-204872.1	319/365	1E-110
Ribosomal protein S23 (RPS23)	427323	XM-424903.2	287/307	3E-126
Ribosomal protein L21 (RPL21)	418933	BX933053.1	372/401	8E-163
Ribosomal protein L37a (RPL37A)	769981	NM-0010731.1	259/291	4E-96
Ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)	395970	NM-0014698.1	155/167	4E-62
Solute carrier family 38, member 2 (SLC38A2)	417807	NM-001030741.1	217/235	1E-31
Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta (PRKACB)	424542	XM-422379.2	240/287	2E-62
Leukocyte cell-derived chemotaxin 2 (LECT2)	396471	CR388911.1	292/343	1E-90
Similar to <i>C. elegans</i> R06F6. 8 (Sw: Q09417) (KIAA1432)	427226	XR-026743.1	227/248	1E-90
Serine incorporator 1 (SERINC1)	421722	NM-001031074.1	130/154	3E-32
IQ motif containing B1 (IQCB1)	424242	XM-422091.2	508/556	2E-28
Inter-alpha (globulin) inhibitor H3 (ITIH3)	415901	XM-414253.2	517/565	2E-22
Bromodomain containing 7 (BRD7)	415730	NM-001005839.1	223/243	2E-90
Ras homolog gene family, member A (RHOA)	395442	NM-204704.1	324/359	2E-127
Fibrinogen beta chain (FGB)	373926	NM-001167683.1	116/136	1E-27
Chromosome 12 open reading frame 11 (C1H12orf11)	418213	XM-416439.2	348/416	5E-100
Hypothetical gene supported by CR40628 (LOC421379)	421379	XM-429844.2	220/236	1E-93
Coiled-coil domain containing 88C (CCD88C)	423410	XM-421320.2	159/177	3E-57
Sp3 transcription factor (SP3)	395302	AJ719471.1	143/149	6E-45
Osteopetrosis associated transmembrane protein 1 (OSTM1)	421773	NM-001031077.1	153/159	1E-32
Acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl (ACOX1)	417366	NM-001006205.1	151/157	2E-11

Gene identification	GENE ID	Best match accession No.	Identity	E-value
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle (ATP5A1)	374159	NM-204286.1	197/214	3E-80
Cytoplasmic beta-actin gene (ACTB)	396526	XM-00182.1	315/330	2E-147
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 (MAP3K5)	421688	XM-419725.2	267/288	2E-114
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1)	396529	NM-205520.4	170/179	9E-18
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 5 (SMARCA5)	422457	XM-001234485.1	587/612	3E-80
Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4 (LOC415444)	415444	XR-026878.1	164/172	3E-16
Solute carrier family 25, member 13 (citrin) (SLC25A13)	428427	NM-001012949.1	151/156	1E-56
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (YWHAE)	417554	NM-001006219.1	348/371	2E-154

表中显示的是在原鸡数据库中同源性较高的基因。下表同

Data shown in the table are known sequences with a high homology compared with chicken databases. The same as follows

表 2 SSH 技术筛选人工感染 DHV 后在病鸭肝脏的下调表达基因

Table 2 List of down-regulated genes identified with SSH technology in duck liver infected DHV

Gene identification	GENE ID	Best match accession No.	Identity	E-value
Albumin (ALB)	396197	NM-205261.1	406/438	3E-179
Transthyretin (TTR)	396277	NM-205335.2	172/182	1E-73
Carbonic anhydrase VB, mitochondrial (CA5B)	415833	XM414195.2	486/649	2E-61
Exosome component 2 (EXOSC2)	417182	AJ721096.1	389/390	2E-161
Partial TLR7 gene for toll-like receptor 7 (TLR7)	418638	AJ632302.1	201/201	2E-101
2-hydroxyacyl-CoA lyase 1 (HACL1)	420638	NM-001199628.1	246/266	1.8E-103
Serpin peptidase inhibitor, clade A (SERPINA4)	423433	XM-421342.2	671/763	8E-151
Mitofusin 1 (MFN1)	424973	AJ720109.2	290/290	1E-150
TAR DNA binding protein (TARDBP)	419453	NM_001030878	234/234	3E-81
Kelch-like 18 (KLHL18)	420406	NM_001030960	224/224	4E-114
Regulation of nuclear pre-mRNA domain containing 1A (RPR1A)	420953	NM_001031005.2	484/485	5E-80
Toll-like receptor 6 (TLR6)	426274	NM_001007488.3	247/247	6E-127
Ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2 (UBE2R2)	427021	NM_001031411.2	148/149	3E-60
Aldolase B, fructose-bisphosphate (ALDB)	427308	NM_001007977.1	438/500	8E-161
TAF2 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor (TAF2)	428389	NM_001031508.1	168/168	5E-83
LOC416453 similar to FLJ20359 protein MGC63553 (LOC419429)	419429	NM_001030875	277/278	2E-142
Kelch-like 18 (KLHL18)	420406	NM_001030960.2	224/224	4E-114
Serpin peptidase inhibitor, clade A alpha-1 (SERPINA1)	423434	XM_421343.2	833/992	3E-82

3 讨论

抑制性消减杂交技术是 Diatchenko 等在抑制性 PCR 基础上建立起来的一种 cDNA 消减杂交方法, 结合了抑制 PCR 和消减杂交技术, 是一种简单、

快速的分离差异基因的方法^[6-7]。SSH 技术自报道以来, 由于其试验方法的优越性, 已经被迅速应用于动物疾病发病机制的研究^[8-10]。本试验利用抑制性消减杂交技术, 筛选在富集 2¹⁰ 下差异表达的基因, 最终鉴定出 70 个差异表达的基因, 其中上调基因

52 个,下调基因 18 个,高表达基因高达 74%。本试验筛选出的差异基因绝大多数为最新报道的基因。经聚类分析和参阅大量文献可知,本次筛选出的差异基因功能主要涉及到合成细胞组分、分子功能和生物学过程等多个复杂过程,这样多种类型差异表达基因的出现提示雏鸭肝炎是一个涉及多层次调控水平(染色质水平、转录水平、转录后水平、翻译水平及翻译后水平等)由大量基因参与的复杂分子过程。此外,131 条 ESTs 未检索到同源序列,这表明雏鸭肝炎可能还涉及一些目前尚未认识的过程,还需要对这些未知功能基因进行进一步研究。更值得关注的是,168 条已知 ESTs 中,出现部分基因参与了与疾病相关的代谢、调节等生理过程。如上调基因 SPEN 是调节许多信号传导途径的关键转录因子,一些 SPEN 家族蛋白可能应答许多级联调节同源核蛋白的功能,以此来控制细胞周期,神经细胞的命运以及轴突的导向性^[11-13]。又如 HSP90 基因调控细胞内细胞增殖、分化、存活以及凋亡等生命过程,在许多肿瘤细胞中呈过度表达,已成为肿瘤治疗、细胞免疫、信号转导以及应激调节等领域的新热点^[14-16]。下调基因如 TLR6 和 TLR7 均为 TLRs 家族中的重要成员,能指导合成一种细胞表面信号传导跨膜受体,在识别细菌等病原微生物及介导的炎症反应信号通路中有重要作用,其表达异常与自身免疫性疾病关系密切^[17]。又如 ALB 基因,有 60 个阳性克隆来自该基因,说明该基因可能在雏鸭肝炎致病过程中起作用,且有研究表明,在 DHV 感染后肝细胞中 ALB 基因的表达量下降会引起肝脏中白蛋白水平的显著降低^[18-20]。本试验与王红^[21]用抑制性消减杂交方法筛选雏鸭肝炎病毒感染后差异基因的表达状况有较大差异,可能是由于其选择的克隆数过少,仅筛选出 10 个差异表达基因,且其选择的材料是肝脏、脾脏、肾脏、脑 4 种组织样的混合物。而本研究选用全同胞同性别的金定鸭肝脏组织为试验材料,能最大限度地扣除遗传背景的差异性,其结果更具说服力。

4 结 论

本研究利用 SSH 技术共筛选出 299 条 ESTs (上调 222 条,下调 77 条),基因 70 个,其中上调 52 个,下调 18 个,它们与信号传导、代谢调节、细胞生长增殖等生命过程相关。未知 ESTs 131 条可能对应于一些新基因或者未知基因,说明该消减 cDNA

文库是一个高质量的文库,研究结果为研究新基因的功能,发现雏鸭肝炎信号通路,探索雏鸭肝炎分子机理等奠定了分子基础。

参考文献:

- [1] BARBARAR R. Morocco's Plan Moutonnier-designated breeding areas to sustain local sheep breeds [C]//DAFYDD P. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2007; 252-256.
- [2] 赵海全,王丙云,冯 军.人工感染鸭肝炎病毒对雏鸭肝组织的损伤作用 [J]. 中国兽医科技,2002,32(5): 22-24.
- [3] 孔留五,罗玉均,张桂红,等. I 型鸭肝炎病毒的 VP1、3D 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达 [J]. 微生物学报,2008,35(7):1068-1071.
- [4] 刘家森,甘一迪,姜 骞,等. 鸭肝炎病毒 I 型 VP3 基因的克隆及原核表达 [J]. 中国兽医科学,2008,38(7):587-590.
- [5] 刘艳萍,丁春宇,马学军,等. 用 RT-PCR 检测鸭肝炎病毒 [J]. 中国兽医杂志,2008,44(4):18-19.
- [6] DIATCHENKO L, LAU Y F C, 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*, 1996,9(3):6025-6030.
- [7] AKOPYANTS N S, FRADKOV A, DIATCHENKO L, et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998,95(22):13108-13113.
- [8] LARSEN A N, SOLSTAD T, SVINENG G, et al. Molecular characterization of a goose-type lysozyme gene in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009,26:122-132.
- [9] MUNIR S, KAPUR V. Transcriptional analysis of the response of poultry species to respiratory [J]. *Pathogens Poult Sci*, 2003,82:885-892.
- [10] MOENS L N, SOETAERT A, van der VEN K, et al. Use of suppression subtractive hybridization PCR for the development of cDNA arrays for the detection of endocrine disruption in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2007, (2): 18-33.
- [11] 李军锋. 泛素-蛋白酶体途径参与小鼠 SPEN 家族 MINT 蛋白转录调控作用的研究 [D]. 西安:中国人

- 民解放军第四军医大学, 2006.
- [12] REBAY I, CHEN F L, HSIAO F, et al. A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the yan gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein [J]. *Genetics*, 2000, 154(2): 695-712.
- [13] MACE K, TUGORES A. The product of the split ends gene is required for the maintenance of positional information during *Drosophila* development [J]. *BMC Dev Biol*, 2004, 4(1): 15-22.
- [14] 田阳斌, 冯选明. 乳腺浸润性小叶癌中 HSP90 的表达及其预后的研究 [J]. 医学信息(中旬刊), 2010, (9): 2317-2319.
- [15] XU Q B. Role of heat shock proteins in atherosclerosis [J] *Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(10): 1547-1559.
- [16] 成 钢, 胡维新. 热鸡蛋蛋白 90 的生物学特性 [J]. 生命的化学, 2009, 29(5): 687-689.
- [17] ISHII K J, UEMATSU S, AKIRA S. 'Toll' gates for immunotherapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(32): 4135-4142.
- [18] 许 鸣, 张 智. 慢性肝病患者血中白蛋白基因表达研究 [J]. 中国医学工程, 2010, 18(3): 1-4.
- [19] CHEUNG S T, FAN S T, LEE Y T, et al. Albumin mRNA in plasma predicts post-transplant recurrence of patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Transplantation*, 2008, 85: 81-87.
- [20] 左国华. 肝癌患者外周血中循环肿瘤细胞的检测及其生物学特征 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
- [21] 王 红. 雏鸭感染 I 型鸭肝炎病毒相关基因的筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.

(编辑 郭云雁)