

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00001

碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾基因的差异表达

么宗利^{1,2}, 应成琦¹, 周凯¹, 王慧¹, 来琦芳¹

1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 中国水产科学研究院盐碱地渔业工程技术中心, 上海 200090;

2. 同济大学 环境科学与工程学院, 污染物控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

摘要: 以广盐性养殖的凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)为研究对象, 采用抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)和定量 PCR 的方法, 研究其在高碳酸盐碱度胁迫下转录组水平的基因表达差异, 以期从基因组水平研究对虾对高碳酸盐碱度胁迫的适应机制。结果表明, 以高碳酸盐碱度(20 mmol/L)胁迫第 4 天凡纳滨对虾鳃组织和低碱度(2 mmol/L)对照组鳃组织为材料, 通过斑点杂交筛选, 发现鳃组织中有 158 个克隆子表达上调, 291 个克隆子表达下调。挑选 150 个高表达差异的克隆子进行测序, 获得 100 个序列, 其中 50 个得到成功注释。经过 GO 分析, 这些注释的差异基因主要分为 8 大类群, 其中碳酸酐酶基因(CA)、Na⁺-K⁺-ATPase 基因(NKA- α)等与离子调控相关的基因表达量上调, 而溶菌酶基因等与先天免疫相关的基因表达量下调, 这些结果表明高碳酸盐碱度胁迫下, 凡纳滨对虾以增加离子调控的方式进行酸碱平衡的调控, 同时其免疫功能受到抑制。此外, 还对 CA 和 NKA- α 两个基因在鳃和触角腺中的时空表达规律进行了研究, 发现高碳酸盐碱度胁迫 9 d 过程中, 两个基因在鳃组织中的表达均呈现先高表达后回落的现象, 而在触角腺中 NKA- α 基因则一直维持较高表达水平, 说明 CA 和 NKA- α 基因在凡纳滨对虾高碳酸盐碱度适应离子调控中起着关键作用, 同时还发现除了鳃组织之外, 触角腺同样参与了调控。本研究从转录水平初步筛选了高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾的表达差异基因, 探索了凡纳滨对虾的耐盐碱机制, 对培育适于盐碱地水产养殖的优良品种有着重要的意义。

关键词: 凡纳滨对虾; 高碳酸盐碱度; 基因表达; SSH; 定量 PCR

中图分类号: S961

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0001-12

中国拥有广袤的盐碱水资源, 盐碱水环境的高碱度是制约水生生物生存、生长的关键因子之一。碱度是指水中能与强酸发生中和作用的物质总量, 包括 HCO₃⁻、CO₃²⁻等弱酸根, OH⁻等强碱以及 NH₃ 等弱碱性物质。一般水体的总碱度主要由 HCO₃⁻、CO₃²⁻ 构成, 称之为碳酸盐碱度。高碳酸盐碱度对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)^[1]和凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[2]具有较强的毒害作用。国内外相关的研究主要集中在 pH 胁迫下对虾生理、生化的响应^[3-4]。高 pH 环境会

导致对虾 DNA 损伤^[4]、抗氧化酶基因表达上升^[4-5]、离子调控相关酶类^[6]活性上升、耗氧率升高^[7]以及 SOD 等免疫相关酶^[4]活性下降和抗病力下降^[8]。高碳酸盐碱度与高 pH 不同之处在于, 除了由于高 pH 对生物造成的胁迫外, 高 CO₃²⁻ 和 HCO₃⁻ 浓度也会影响水生动物的生存^[2, 9]、发育以及繁殖^[10], 研究碳酸盐碱度胁迫下对虾的基因表达差异, 对于更深一步了解盐碱水对养殖生物的胁迫机制具有重要的意义。

凡纳滨对虾俗称南美白对虾, 是世界对虾养

收稿日期: 2011-06-23; 修订日期: 2011-08-15.

基金项目: 农业部公益性行业科研专项资金项目(200903001-0502); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院东海水产研究所)资助项目(2007Z03, 2009M03).

作者简介: 么宗利(1978-), 男, 博士研究生, 助理研究员, 研究方向为环境生物学. E-mail: zlyao@126.com

通信作者: 来琦芳, 研究员, 硕士生导师. Tel: 021-65684655; E-mail: qifanglai@163.com

殖三大优良品种之一。由于凡纳滨对虾对水环境的适应性强,从中国南方到北方,凡纳滨对虾的养殖规模不断扩大,已经成为对虾养殖的支柱产业,对中国对虾养殖产量的恢复起到了重要作用^[11-12]。凡纳滨对虾为广盐性虾类,对盐度、高碳酸盐碱度显示出较强耐受性,经驯化的凡纳滨对虾可以在盐度为 5~35,碳酸盐碱度为 16 mmol/L 的水环境中生存生长^[2, 13]。虽然凡纳滨对虾已经实现在盐碱水域养殖^[14],但是由于盐碱水域中高碳酸盐碱度和高 pH 的胁迫,使得对虾成活率相对较低。因此研究盐碱胁迫下凡纳滨对虾的基因表达差异,对于揭示甲壳动物的耐碱机制、提高盐碱水域对虾养殖的成活率以及指导生产都有着重要的意义。

本研究应用 SSH 和定量 PCR 的方法,从分子水平研究高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾的生理响应,构建高碳酸盐碱度胁迫诱导的 SSH-cDNA 文库,探索凡纳滨对虾耐盐碱相关基因,为揭示凡纳滨对虾的耐盐碱机理、耐盐碱品系的选育奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用凡纳滨对虾采集自东海水产研究所海南实验基地,经盐度过渡后挑选健康的凡纳滨对虾分别放入相应的实验水体中,实验过程中取鳃及触角腺。

1.2 碳酸盐碱度胁迫实验设计

根据前期实验结果^[2],本实验设置对照组(盐度 5,碳酸盐碱度 2 mmol/L)和高碳酸盐碱度胁迫组(盐度 5,碳酸盐碱度 20 mmol/L)。实验用水采用朱树屏^[15]人工海水 B 液配方配制成盐度为 5 的人工海水(除 HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 外),再根据实验设置加入相应量的碳酸钠和碳酸氢钠(AR),全部溶解稳定 24 h 后使用。实验期间水体为 15 m³,盐度为 5,水温为(25.0±0.5)℃,每组设置 3 个重复,每个重复放实验虾 270 尾。实验虾体长为(10.27±0.05) cm,体质量为(12.91±0.11) g。实验周期为 9 d。

实验养殖期间,每天早晚各投喂颗粒饲料 1 次,每天换水 50%,并监测 pH 值和碳酸盐碱度,

以保证实验用水的稳定性。pH 值测定采用 DELTA320 型精密 pH 计 (METTLER TOLEDO);碳酸盐碱度测定采用酸碱滴定法^[16]。

1.3 样品采集和处理

胁迫第 1~9 天,每天定时取样,每个重复组取 15 尾存活的对虾,在冰上解剖,分离鳃和触角腺,放入 1.5 mL 离心管中,液氮速冻,−80℃保存。根据高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾血液生理指标变化规律,选择生理指标变化明显的第 4 天鳃组织样品用于消减文库构建,其他样品均用于定量 PCR 实验。

1.4 方法

1.4.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将对照组和胁迫组每天取样的对虾鳃、触角腺($n=6$)组织分别在液氮中研磨成粉末后,用 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA 后,分别等质量混合;用 SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech) 反转录,用 PCR Clean 试剂盒 (Axygen) 纯化双链 cDNA;用 1.2% 琼脂糖 EB 凝胶电泳鉴定 RNA 及 cDNA 的完整性,同时用 Nano Drop ND-1000 微量紫外/可见分光光度计测定总 RNA 及 cDNA 浓度。

1.4.2 抑制消减杂交 抑制消减杂交采用 PCR-SelectTM cDNA subtraction Kit (Clontech) 进行,实验步骤参照试剂盒操作说明,杂交及杂交效率分析过程中所用到的接头和引物序列见表 1。以高碳酸盐碱度胁迫组第 4 天对虾鳃组织和对照组第 4 天对虾鳃组织为研究对象,分别构建正反向消减 cDNA 文库。cDNA 合成双链 cDNA 后,经 *Rsa* I 酶切后,将 Tester cDNA 分别平均分成 2 份,分别连接 Adaptor 1(10 μmol/L)和 Adaptor 2R (10 μmol/L),与过量的 Driver cDNA 进行第 1 次杂交。混合两份杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA 进行第 2 次杂交。杂交产物随后用 PCR primer 1 进行抑制性 PCR,然后用 Nested primer 1 和 2R 进行第 2 次 PCR 扩增。

1.4.3 连接效率分析 采用管家基因 β -actin 分析连接效率。凡纳滨对虾 β -actin (GenBank accession No. AF300705) 在 955 bp 处有 *Rsa* I 酶切位点,为 PCR Primer1 接头结合位点,与管家基因下游引

表 1 抑制消减杂交过程中所用到的接头和引物序列
Tab. 1 Adaptor and primer sequences used in SSH

引物名称 primer name	序列(5'-3') sequence(5'-3')
cDNA synthesis primer	TTTTGTACAAGCTT ₃₀ N ₁ N
Adaptor 1	CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCGGGCAGGT
Adaptor 2R	CTAATACGACTCACTAT AGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
PCR primer 1	CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR Primer1	TCGAGCGGCCGCGGGCAGGT
Nested PCR Primer2R	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
β -actin F1	AATCGTTCGTGACATCAA
β -actin R1	TTGTAGGTGGTCTCGTGG

物 (β -actin R1)共形成 289 左右的片段。管家基因上下游引物(β -actin F1, β -actin R1, 表 1)的起始、终止位点位于 695 bp 和 913 bp 处, 全长 219 bp。

1.4.4 消减 cDNA 文库的构建 将凡纳滨对虾鳃组织消减后的第 2 次 PCR 产物连接到 pED-T vector (SinoBio)中, 转化入 DH5 α (Gibco) 感受态细胞, 在含 X-gal/IPTG 的琼脂平板上 37℃培养过夜, 挑取白色菌斑培养。以 1 μ L 培养的菌液作为模板, 用 Nested PCR Primers 1 和 Adaptor 2R 进行 PCR 扩增, 总体积为 25 μ L。反应条件: 94℃ 10 min; 94℃ 10 s, 68℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 25 个循环; 72℃ 5 min。各取 5 μ L 扩增产物用 2 % 琼脂糖凝胶电泳(EB 染色)检测。

1.4.5 斑点杂交 经蓝白斑培养基筛选, 每个文库随机挑选 384 个白斑克隆, PCR 鉴定后, 进行斑点杂交实验。斑点杂交采用放射性同位素标记的方法。根据设计好的方阵点膜, 每个点各取 1 μ L PCR 产物(插入片段鉴定 PCR 产物)点膜, 每个点 0.4 μ L, 约 10 ng ³²P 标记的正向消减探针和反向消减探针(分别为正向和反向消减产物)分别与膜上探针进行杂交, 探针标记及纯化用法玛西亚探针试剂盒, 杂交液选用 ULTRAhyb (Ambion), 杂交洗膜后用 Cyclone PacKard 扫描仪进行信号扫描及定量分析。

1.4.6 测序及序列比对 挑选斑点杂交差异表达 2 倍以上的基因随机测序, 测序序列去载体和接头序列后用 CAP3 拼接软件进行处理。所有测得的 EST 有效序列用 tBlastX 和 BlastN 软件与 NCBI 数据库进行比对后。比对 *e* 值小于 10⁻⁵ 且长度大

于 50 bp 的序列进行后续分析。应用 GoPipe 软件^[17]对选入的基因序列进行功能分类分析(gene ontology)^[18]。

1.4.7 定量 PCR 分析基因时空表达差异 总 RNA 提取自实验中凡纳滨对虾的鳃、触角腺。凡纳滨对虾 β -actin (GenBank access. No. AF300705), 碳酸酐酶基因(CA, GenBank access. no. BF024146), 和 Na⁺-K⁺-ATPase α 基因(NKA- α , GenBank access. no. GU004027)均由 NCBI GenBank 中获得。3 个基因序列分别与 GenBank 中其他物种的对应基因进行比对分析后, 选择高度保守区域用于荧光定量 PCR 的引物设计。引物用 Primer3 软件^[19]设计完成。引物序列见表 2。

基因表达采用 SYBR 定量 PCR 法, PCR 在 LightCycler1.2 (Roche)上进行, 反应体系包括 1 μ L cDNA, 0.2 μ L 上下游引物和 SYBR master mix 5 μ L (TOYOBO), 总体积为 10 μ L。反应条件如下: 95℃ 10 s, 1 个循环; 95℃ 5 s, 60℃ 20 s, 40 个循环。每个反应结束后用熔解曲线确认 PCR 产物的单一性。同时抽取代表性样品进行琼脂糖凝胶电泳, 以进一步确认 PCR 产物。每个基因均以模板浓度为梯度、以 β -actin 为内参建立标准曲线, 验证基因表达的线性规律。每批反应均设阴性对照, 确保反应体系未受污染。基因表达倍数用 $\Delta\Delta$ CT 法计算^[20], β -actin 为内参。

1.5 统计分析

各个组织及时间的表达数据分别进行方差齐性分析(Levene's test and Shapiro-Wilk's test)后, 单因素方差分析检验不同胁迫组及胁迫时间下基

表 2 用于定量 PCR 分析的引物序列
Tab.2 Primer sequences used in real-time PCR assays

引物名称 primer name	序列(5'-3') primer sequence(5'-3')	引物位置(mRNA) primer position(mRNA)	产物大小/bp final product size
NKA- α F	GTATCCATCCACGAGACTGAG	313-333	162
NKA- α R	AAGGTAGGCATTGTTGAAAGC	454-474	
CA2 F	ACCTGAATGACGACGATGAC	172-191	205
CA2 R	GTAAATGGAATTGAGCGAAAGC	355-376	
β -actin F2	CGACCTCACAGACTACCT	623-640	89
β -actin R2	TGATGTCACGAACGATTT	694-711	

因表达差异显著性, 差异显著则进行 SNK 多重比较, 所有统计分析均用 SAS 8 进行^[21], 差异检验水平为 0.05。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 提取及反转录

提取的凡纳滨对虾鳃、触角腺总 RNA 均由 28S、18S 和 5S 3 条带组成, 琼脂糖电泳显示条带清晰(图 1)。 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0, 说明 RNA 质量良好, 达到建库要求。反转录后的双链 cDNA 经 *Rsa* I 酶切后琼脂糖凝胶电泳检测结果显示 cDNA 酶切效果良好(图 2), 符合下一步实验要求。

2.2 连接效率分析

在 Tester 或 Driver 组的 cDNA 两端加接头是为了能够在两轮杂交之后用巢氏 PCR 扩增得到差异表达基因, 使差异目的基因得以富集。将经过

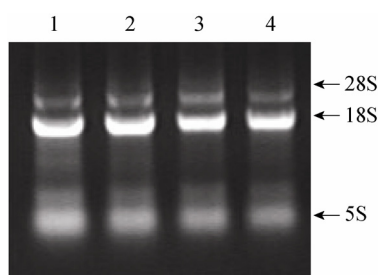


图 1 凡纳滨对虾鳃和触角腺总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳
1: 对照组鳃总 RNA; 2: 20 mmol/L 碱度处理组鳃总 RNA; 3: 对照组触角腺总 RNA; 4: 20 mmol/L 碱度处理组触角腺总 RNA.
Fig. 1 Total RNA extracted from gills and antennal gland of *Litopenaeus vannamei*
1: RNA from gill of control group; 2: RNA from gill of group under 20 mmol/L alkalinity exposure; 3: RNA from antennal gland of control group; 4: RNA from antennal gland of group under 20 mmol/L alkalinity exposure.

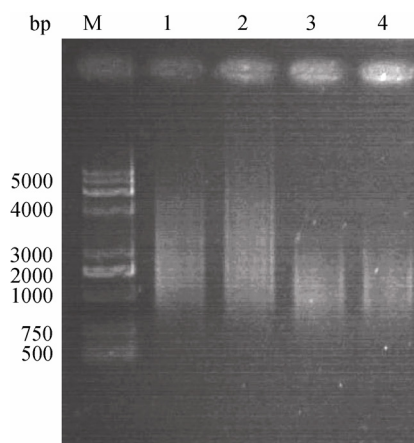


图 2 凡纳滨对虾鳃双链 cDNA 及其 *Rsa* I 酶切产物电泳图
M: DNA marker (DL2000Plus); 1, 2: 对照组及碱度胁迫组凡纳滨对虾鳃 *Rsa* I 酶切前 ds cDNA; 3, 4: 对照组及碱度胁迫组凡纳滨对虾鳃 *Rsa* I 酶切后 ds cDNA.

Fig. 2 Gills ds cDNA of *Litopenaeus vannamei*
M: DNA maker; 1, 2: control and exposure group before *Rsa* I digestion. 3, 4: control and exposure group after *Rsa* I digestion.

Rsa I 酶切的双链 cDNA 平均分为 2 份, 分别加上 adaptor 1 和 adaptor 2R 2 种接头, 从而得到相应的 Tester-1 cDNA, Tester-2R cDNA 或 Driver-1 cDNA, Driver-2R cDNA。接头连接效率的检测结果显示如图 3 所示。以 adaptor 1 和 adaptor 2R 共有的引物 PCR primer 1 同 β -actin R1 引物进行 PCR 的电泳结果见第 1、3、5、7 泳道。以 β -actin 上下游引物(β -actin F1, β -actin R1)进行 PCR 的电泳结果见第 2、4、6、8 泳道。从图中可以看出, 1、3、5、7 泳道的扩增产物多于第 2、4、6、8 泳道, 说明 adaptor 1 和 adaptor 2R 已经链接到 cDNA 上。采用 Bio-Rad VersaDoc4000 凝胶成像系统灰度扫描分析表明, 1、3、5、7 泳道条带的强度与 2、4、6、8 泳道条带强度的比值分别为 0.71、1.21、0.77

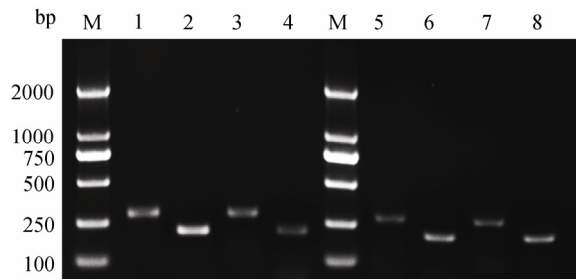


图 3 PCR 检测接头连接效率

M: DNA marker(DL2000); 1: 以 Tester Adaptor 1 为模板的 PCR 产物, β -actin R1 引物和 PCR Primer 1 为上下游引物; 2: 以 Tester Adaptor 1 为模板的 PCR 产物, β -actin R1 引物和 β -actin F1 引物; 3: 以 Tester Adaptor 2R 为模板的 PCR 产物, β -actin R1 引物和 PCR Primer 1 引物; 4: 以 Tester Adaptor 2R 为模板的 PCR 产物, β -actin R1 引物和 β -actin F1 引物; 5: 以 Driver Adaptor 1 为模板, β -actin R1 引物和 PCR Primer 1 引物; 6: 以 Driver Adaptor 1 为模板, β -actin R1 引物和 β -actin F1 引物; 7: Driver Adaptor 2R 为模板, β -actin R1 引物和 PCR Primer 1 引物; 8: Driver Adaptor 2R 为模板, β -actin R1 引物和 β -actin F1 引物

Fig. 3 Results of ligation efficiency analysis

M: marker DL2000; 1: PCR products using Tester 1-1(Adaptor 1-ligated) as template and the β -actin R1 primer and PCR primer1 as primers; 2: PCR products using Tester 1-1 (Adaptor 1-ligated) as template, and the β -actin R1 and β -actin F1 as primers; 3: PCR products using Tester 1-2(Adaptor 2R-ligated) as template and the β -actin R1 and PCR Primer1as primers; 4: PCR products using Tester 1-2 (Adaptor 2R-ligated) as template, and the β -actin R1 and β -actin F1 as primers; 5: PCR products using Driver 1-1(Adaptor 1-ligated) as template and the β -actin R1 and PCR Primer1as primers; 6: PCR products using Driver 1-1 (Adaptor 1-ligated) as template, and the β -actin R1 and β -actin F1 as primers; 7: PCR products using Driver 1-2(Adaptor 2R-ligated) as template and the β -actin R1 and PCR Primer1as primers; 8: PCR products using Driver 1-2 (Adaptor 2R-ligated) as template, and the β -actin R1 and β -actin F1 as primers.

和 0.74, 均大于 25%, 说明接头的连接效率大于 25%, 符合后续实验要求。

2.3 消减杂交效率分析

以鳃 Tester 组消减 cDNA 文库为模板, PCR 检测管家基因 β -actin, 25 个循环处才有微弱的带, 而以未经消减杂交的产物为模板扩增, 在第 20 个循环处就有产物(图 4); PCR 检测管家基因 β -actin 在 Driver 组消减 cDNA 文库中的丰度时, 在 25 个循环后才有微弱的扩增, 而在未经消减杂交的产物中 20 个循环处就有条带(图 4)。管家基因在消减 cDNA 和未消减 cDNA 中丰度出现显著差异, 表明 Tester 和 Driver 中共有的 cDNA 已被有效消除, 同时也表明特异于两个处理组的差异表达基因也相应得到富集。

2.4 差异片段阳性克隆的筛选

消减杂交的产物连入 pED-T vector 载体后进行转化制备得到质粒文库。每个文库挑选出 450 个阳性克隆进行 PCR 筛选鉴定。将非单一产物克隆去除后, 每个文库共筛选得到 384 个单一条带的 PCR 产物并且插入片段大小在 0.1~1.5 kb 之间的阳性克隆。部分 PCR 筛选的结果如图 5 所示。

2.5 斑点杂交筛选差异表达克隆

在鳃组织消减 cDNA 文库中, 每个文库随机挑选 384 个克隆的 PCR 产物, 分别在两张膜上进行斑点杂交。通过斑点杂交, 在表达差异倍数为 2 倍以上的克隆中, 上调的有 158 个, 下调的有 291 个(图 6)。

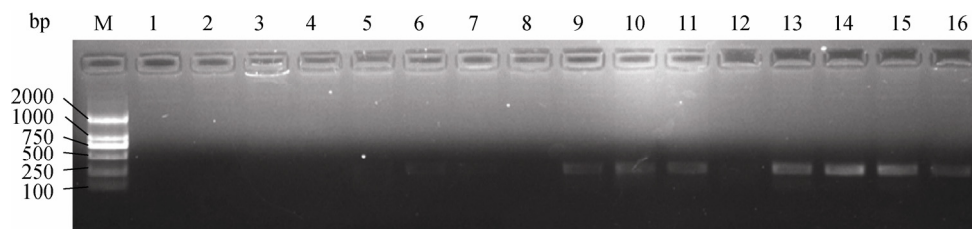


图 4 消减杂交效率分析结果(以凡纳滨对虾 β -actin 基因丰度的变化表示)

M: DNA marker(DL2000); 1,5,9,13: 以 Tester 组消减后的第 2 次 PCR 产物为模板; 2,6,10,14: 以 Tester 组未消减的第 2 次 PCR 产物为模板; 4,8,12,16: 以 Driver 组消减后的第 2 次 PCR 产物为模板; 3,7,11,15: 以 Driver 组未消减的第 2 次 PCR 产物为模板; 1-4: 15 循环; 5-8: 20 个循环; 9-12: 25 个循环; 13-16: 30 个循环。

Fig. 4 PCR analysis of the subtractive hybridization efficiency by β -actin

M: DNA marker(DL2000); 1,5,9,13: PCR products using Tester subtracted cDNA as template; 2,6,10,14: PCR products using Tester unsubtracted cDNA as template; 4,8,12,16: PCR products using Driver subtracted cDNA as template; 3,7,11,15: PCR products using Driver unsubtracted cDNA as template; 1-4: 15 cycles; 5-8: 20 cycles; 9-12: 25 cycles; 13-16: 30 cycles.

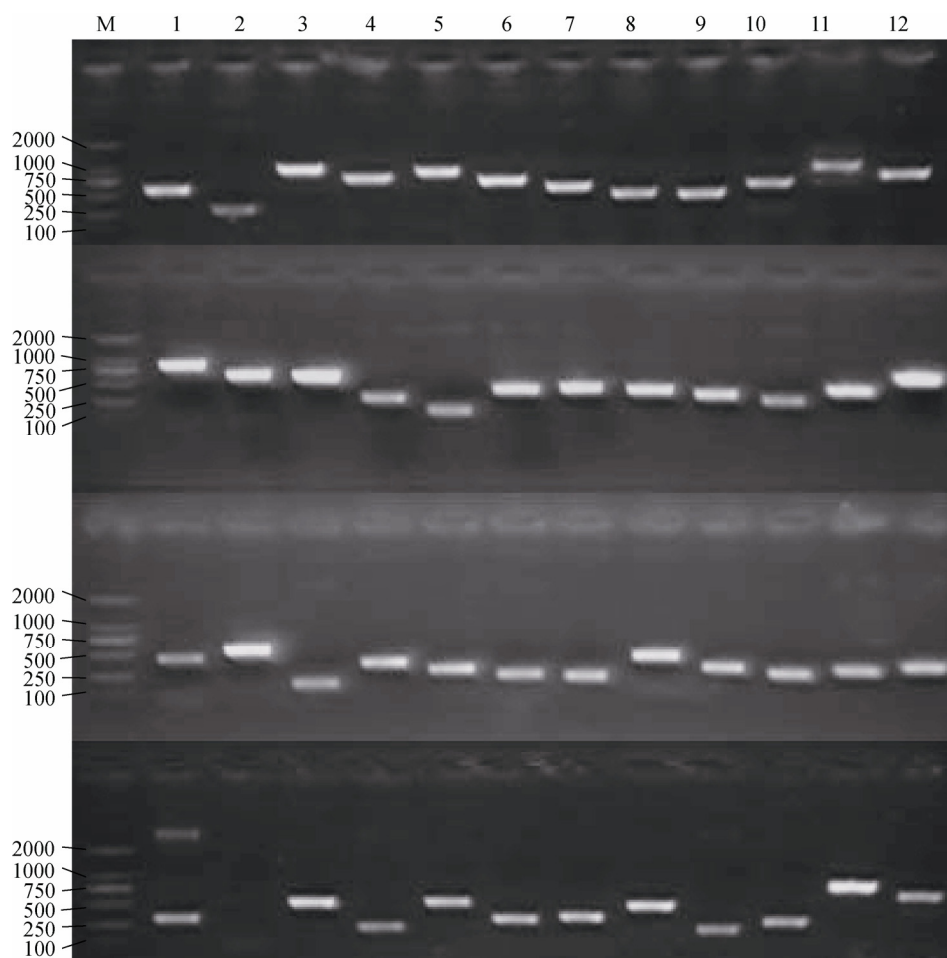


图 5 消减文库 cDNA 片段大小的 PCR 鉴定

M: DNA marker(DL2000); 1-12: 部分阳性克隆菌落的 PCR 鉴定结果.

Fig. 5 PCR selection result of cDNA fragments from the subtractive library
M: DNA marker; 1-12: the randomly picked clones from the subtractive library.

2.6 差异表达克隆的序列测定及生物信息学分析

从斑点杂交差异倍数大于 2 倍的克隆中, 随机挑选 150 个进行测序, 测序成功 100 个。片段大小分布于 118~933 bp, 平均 448 bp。经过 tBlastX 和 BlastN 同源性检索成功注释 50 条序列, 占 50%。在 EST 序列比对结果的基础上, 用 GoPipe 软件对 50 条 EST 进行功能分类分析, GO 按照功能将其分为 8 类: 包括催化活性、细胞、结构分子活性、结合活性、转运活性、繁殖、酶调控因子活性、细胞生理过程(表 3)。其中催化活性相关基因中 *CA* 基因、*NKA-α* 基因表达上调, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(*PEPCK*)则下调; 免疫相关基因中溶菌酶基因下调。

2.7 SSH 文库中 2 个基因的 RT-PCR 分析

2.7.1 *CA* 基因时空表达 从文库中选择 *CA* 和 *NKA-α* 两个基因, 设计引物, 对 20 mmol/L 碱度处理组和对照组处理 9 d 过程中鳃、触角腺的表达模式进行鉴定。碱度胁迫下对虾鳃组织中 *CA* 基因在第 1 天表达量显著上升, 随后在第 2 天下降到初始水平(图 7A)。碱度胁迫下对虾触角腺组织中 *CA* 基因在第 4、5 天表达量显著上升, 随后在第 7 天下降到初始水平(图 7B)。

2.7.2 *NKA-α* 基因时空表达 碱度胁迫下对虾鳃组织中 *NKA-α* 基因在第 1 天表达量显著上升, 随后在第 2 天下降到初始水平(图 8A)。碱度胁迫下对虾触角腺组织中 *NKA-α* 基因在第 1 天表达量

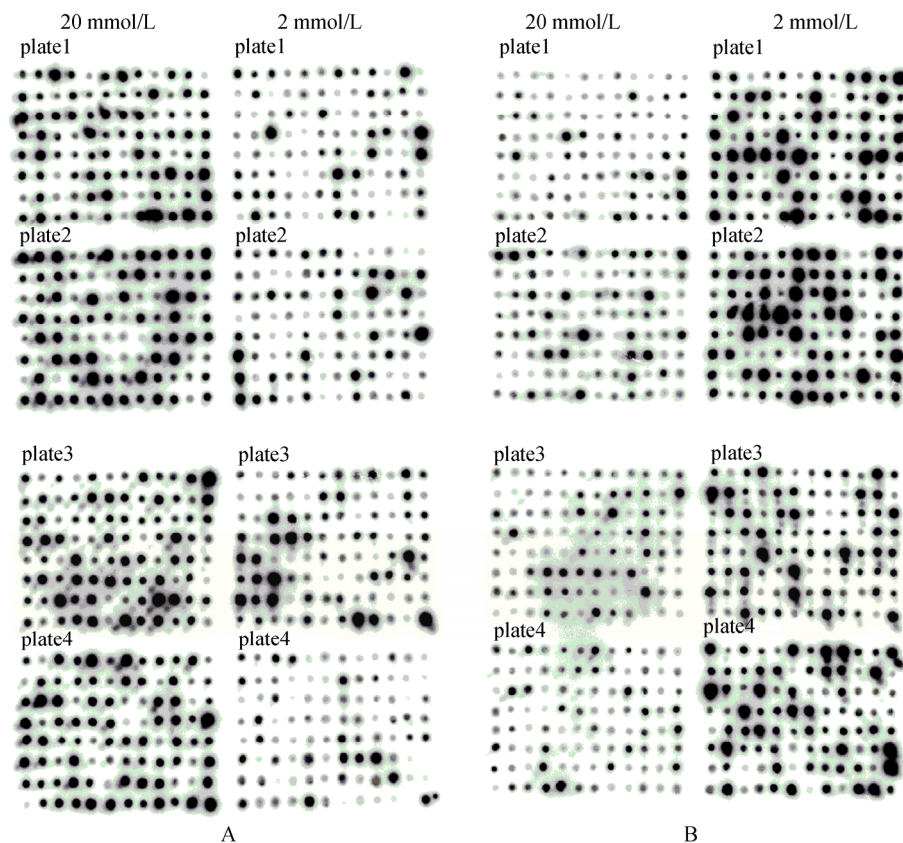


图 6 消减文库中筛选的差异片段克隆的斑点杂交

20 mmol/L 碱度处理组和对照组(2 mmol/L)消减富集的 cDNA 分别点在两张尼龙膜上相同的位点处, 将用 ^{32}P 标记的正向消减探针(A)和反向消减探针(B)分别与膜上的克隆进行杂交。

Fig. 6 Dot blots hybridization of differentially expressed fragments

cDNA clones enriched in 20 mmol/L alkalinity and control(2 mmol/L alkalinity) treatments were spotted via dot blots technique on two nylon membranes and then hybridized with positive subtractive probe(A) and reserve subtractive probe(B).

显著上升, 一直持续到第 9 天(图 8B)。

3 讨论

本研究中高碳酸盐碱度胁迫凡纳滨对虾后, 其鳃 SSH-cDNA 文库中多个基因发生了表达差异, 其中离子调控相关基因表达上调、免疫相关基因下调。对虾耐碱胁迫是一个复杂的过程, 涉及生理、生化及遗传多个方面。因此虾类对高碳酸盐碱度的抵抗能力不仅仅是单个耐受基因的启动和识别, 更重要的是在整个生理过程中多个基因的相互作用。

3.1 碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾鳃差异表达基因

通过对测得基因的 GO 富集分析, 发现高碳酸盐碱度胁迫下, 凡纳滨对虾鳃组织多个功能分类中的基因表达表现出显著差异。其中的催化活

性相关基因和细胞水平的免疫调节相关基因的变化具有重要意义。

催化活性相关基因中 *CA* 基因、*NKA- α* 基因表达上调, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶基因(*PEPCK*)则下调。通常认为酸碱调控^[22]、离子调控和渗透压调节^[23]在水生动物抗盐碱过程中起着关键的作用。*CA* 和 *NKA- α* 基因在甲壳动物的离子调控生理活动中起着重要的作用^[24], 这两个基因的上调为凡纳滨对虾在高碳酸盐碱度环境中的生存争取了时间。*PEPCK* 基因属于裂解酶家族, 是糖异生代谢通路中的关键酶之一, 它的作用是将草酰乙酸盐裂解为磷酸烯醇式丙酮酸和二氧化碳^[25]。同时 *PEPCK* 基因也是谷氨酰胺代谢通路中的重要组分, 参与鱼类组织的酸化过程, 在鱼类酸环境适应中起着关键的作用^[26]。本实验中 *PEPCK* 的

表 3 抑制消减杂交鉴定出在碱度胁迫下差异表达的基因
Fig. 3 Unigenes identified via SSH and Reverse Northern hybridization that display different expression under alkalinity stress

克隆名称 canonical name	功能 function	差异倍数 fold change	克隆长度/ bp length	比对注释 description tBlast2x vs NT
d_tplate3h11	催化活性 catalytic activity	0.20	266	β 微管蛋白 beta tubulin
t_dplate1g8		5.00	632	碳酸酐酶 carbonic anhydrase
d_tplate3a12		0.06	766	磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 phosphoenolpyruvate carboxykinase
t_dplate1g4		5.02	464	$\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase } \alpha$ 亚基 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase alpha subunit}$
d_t-plate2h7	细胞 cell	0.12	402	微管蛋白 α 链 tubulin alpha-1 chain
d_tplate4d4		0.08	242	溶菌酶 lysozyme
d_tplate4d3		0.07	826	NADH 脱氢酶亚基-2 NADH dehydrogenase subunit 2
d_tplate4b2		0.20	499	核糖体蛋白 L18 ribosomal protein L18 CG8615-PA
d_tplate4e3	结构分子活性 structural molecule activity	0.20	319	假定的核糖体蛋白 L16 putative ribosomal protein L6
d_tplate4a11		0.20	354	QM 蛋白 QM protein
d_t-plate2g8		0.12	442	延伸因子 $\alpha 1$ elongation factor 1-alpha
d_tplate1a7		0.04	390	黑化作用蛋白 melanization interactin protein
d_t-plate1h2	转运活性 transporter activity	0.14	843	钙激活氯通道 PREDICTED: similar to calcium-activated chloride channel
d_tplate2h1		0.21	194	核糖体蛋白 L6e ribosomal protein L6e
d_t-plate1c7		0.09	372	核糖体蛋白 L7 ribosomal protein L7
d_t-plate1e8		0.11	300	Kazal 型蛋白酶抑制因子 Kazal-type proteinase inhibitor
t_d-plate3b1	酶调控因子活性 enzyme regulator activity 细胞生理过程 cellular process	22.45	833	未知蛋白 DUF903 protein of unknown function DUF903

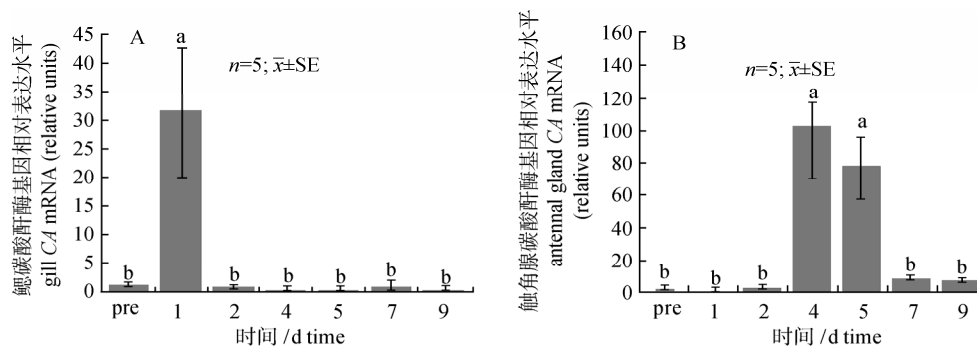


图 7 碳酸盐碱度(20 mmol/L)胁迫下凡纳滨对虾鳃及触角腺碳酸酐酶基因(CA)的表达变化

以 β -actin 为内参进行表达倍数计算. 柱形图上不同字母代表差异显著($P<0.05$).

Fig.7. CA mRNA levels in *Litopenaeus vannamei* gill and antennal gland before and after transfer from control to high alkalinity water (20 mmol/L)

Expression is relative to the expression of β -actin and is normalized to controls. Different small letters denote differences among time points ($P<0.05$).

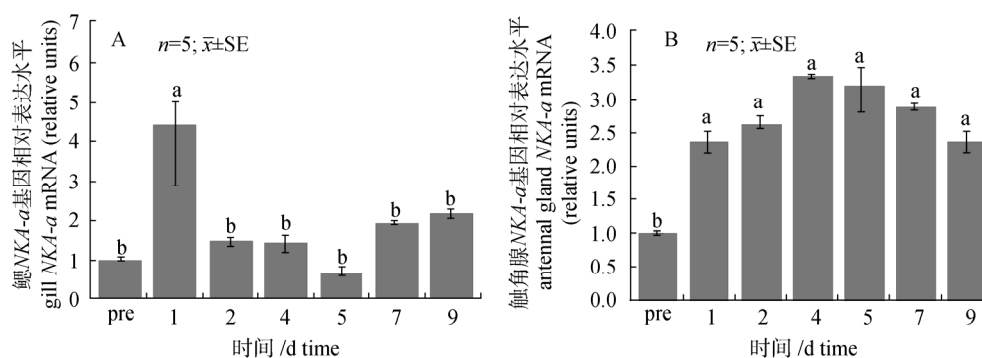


图 8 碳酸盐碱度 (20 mmol/L)胁迫下凡纳滨对虾鳃及触角腺组织 Na^+/K^+ -ATPase α ($NKA-\alpha$)基因表达变化

以 β -actin 为内参进行表达倍数计算. 柱形图上不同字母代表差异显著($P<0.05$).

Fig.8 $NKA-\alpha$ mRNA levels in *Litopenaeus vannamei* gill and antennal gland before and after transfer from control to high alkalinity water (20 mmol/L)

Expression is relative to the expression of β -actin and is normalized to controls. Different small letters denote differences among time points($P<0.05$).

显著性下调,说明这个基因在凡纳滨对虾的高碳酸盐碱度适应过程中起着重要的作用,它的降低可能预示着在碱度胁迫下对虾对能量利用方式的转变,即由直接利用糖变为以利用脂类等其他物质作为能量来源^[27],同时参与虾类的酸碱调控。

免疫相关基因中溶菌酶素基因显著下调。溶菌酶素是一种胞壁酯酶,其功能是通过破坏细菌的细胞壁,为动物先天性免疫系统的重要组成部分,在哺乳动物中具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤的功効^[28]。本研究结果与高 pH 胁迫下虾类免疫力下降的研究结果较一致。多种环境胁迫因子均会导致动物的免疫力下降, Yada 等^[29]2006 年的研究表明,当虹鳟(*Oncor-*

hynchus mykiss)暴露于酸性环境中,体内的溶菌酶活性降低。碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾溶菌酶基因表达量的降低,提示高碳酸盐碱度胁迫可能抑制了对虾的先天性免疫能力,导致对虾的抵抗能力下降,实际生产中应该加强防病、控病。

除此之外,表 5 中列出的其他表达差异基因,如与细胞结构有关的微管蛋白基因,与繁殖相关的核糖体蛋白基因,与钙调控相关的钙激活氯通道基因都可能参与了高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾的生理调节。

3.2 CA 及 NKA- α 基因时空表达规律

通过对在 SSH 中上调的 2 个离子调控相关基因在凡纳滨对虾鳃和触角腺中的时空表达规律分

析发现,在高碳酸盐碱度胁迫的第 1 天,凡纳滨对虾鳃组织中的 *CA* 基因表达量上升为对照组的 30 倍,之后在第 2 天回落到初始水平。推测凡纳滨对虾在高碳酸盐碱度胁迫下会发生急性呼吸性和代谢性碱中毒,表现为增强 *CA* 基因的表达量来调节体内的酸碱平衡。碳酸酐酶(*CA*)是一组参与体内酸碱平衡调节及离子交换等过程的含 Zn 金属酶。一些广盐性甲壳动物在适应外界环境过程中,*CA* 是参与体内离子调节、血淋巴渗透调节、酸碱平衡等生理生化过程中最重要的核心酶之一^[30],也是可逆催化 CO_2 水合过程的酶,因为有 CO_2 和带电离子(H^+ 和 HCO_3^-)的参与,在许多生理和生化过程中起潜在的重要作用^[31-32]。本实验中,触角腺中的 *CA* 基因同样出现了表达量大幅度增高的现象,与鳃相比,触角腺中的 *CA* 基因高表达出现较晚,说明触角腺在凡纳滨对虾高碳酸盐碱度应激调控中同样起着重要的作用,但是参与调控的时间较鳃晚。

与 *CA* 基因类似,高碳酸盐碱度胁迫下,凡纳滨对虾的鳃和触角腺中的 *NKA- α* 基因在第 1 天就表现出 2~4 倍的上升,之后鳃组织 *NKA- α* 基因表达量回落到初始水平,触角腺中的 *NKA- α* 基因则保持在较高水平。鳃中的 *NKA- α* 基因在脊椎动物和无脊椎动物的离子调控和细胞水平平衡以及渗透调控中起着核心作用^[33-35]。高 pH 的胁迫使得对虾鳃的 *NKA- α* 活性在胁迫后的第 72 h 开始升高,之后回落到初始水平。本实验中高碳酸盐碱度下 *NKA- α* 基因表达量的升高,说明在高碳酸盐碱度环境中,凡纳滨对虾除了应对酸碱平衡的调控,同时面临着体内离子失衡的威胁。当体外的碱度环境增高后,水生动物体内 pH 上升,面临着排氮困难,同时导致了 Na^+ 、 Cl^- 离子的调控失衡^[36]。触角腺中 *NKA- α* 基因的高表达量进一步证明了在长期高碳酸盐碱度胁迫下触角腺参与调控的可能性。

从本研究的结果可以看出,高碳酸盐碱度胁迫下凡纳滨对虾中参与多个生理调控过程中的基因表达发生了变化,尤其是离子调控、免疫调节。通过对 *CA*、*NKA- α* 基因的时空表达差异研究可以看出,这两个基因在凡纳滨对虾的酸碱调节过程

中起着重要的作用。与此同时本研究首次揭示了触角腺在凡纳滨对虾高碳酸盐碱度适应过程中的重要作用。本研究发掘到的相关基因对凡纳滨对虾盐碱适应机制的揭示,以及培育耐盐碱品种都有着重要的意义。

参考文献:

- [1] 房文红,王慧,来琦芳.碳酸盐碱度、pH 对中国对虾幼虾的致毒效应[J].中国水产科学,2000,7(4):78-81.
- [2] 么宗利,王慧,周凯,等.碳酸盐碱度和 pH 值对凡纳滨对虾仔虾存活率的影响[J].生态学杂志,2010(5):945-950.
- [3] Cheng W, Chen J C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Fish Shellfish Immun, 2000, 10(4): 387-391.
- [4] Wang W N, Zhou J, Wang P, et al. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress[J]. Comp Biochem Phys C, 2009, 150(4): 428-435.
- [5] Zhou J, Wang W N, Wang A L, et al. Glutathione S-transferase in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Characterization and regulation under pH stress[J]. Comp Biochem Physiol C, 2009, 150(2): 224-230.
- [6] Pan L Q, Zhang L J, Liu H Y. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae[J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 711-720.
- [7] Zhang P D, Zhang X M, Li H, et al. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)[J]. Aquaculture, 2006, 256(1-4): 579-587.
- [8] Li C C, Chen J C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress[J]. Fish Shellfish Immun, 2008, 25(6): 701-709.
- [9] 雷衍之,董双林,沈成钢.碳酸盐碱度对鱼类毒性作用的研究[J].水产学报,1985(2):171-183.
- [10] Yao Z L, Lai Q F, Zhou K, et al. Developmental biology of medaka fish (*Oryzias latipes*) exposed to alkalinity stress[J]. J Appl Ichthyol, 2010, 26(3): 397-402.
- [11] 张伟权,于琳江,童保福,等.南美洲白对虾全人工授精技术研究[J].海洋与湖沼,1993(4):428-432.

- [12] 曾现英, 徐高峰, 张新峰. 北方盐碱洼地养殖南美白对虾试验[J]. 淡水渔业, 2004(5): 34–35.
- [13] McGraw W J, Davis D A, Teichert-Coddington D, et al. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: Influence of age, salinity endpoint, and rate of salinity reduction[J]. J World Aquacult Soc, 2002, 33(1): 78–84.
- [14] 王慧, 来琦芳, 房文红. 沧州运东地区盐碱水资源对开展渔业的影响[J]. 河北渔业, 2003(5): 16–18.
- [15] 湛江水产专科学校. 海洋饵料生物培养[M]. 北京: 农业出版社, 1980: 212.
- [16] 臧维玲. 养鱼水质分析[M]. 北京: 农业出版社, 1991.
- [17] 陈作舟, 薛成海, 朱晟, 等. GoPipe: 批量序列的 Gene Ontology 注释和统计分析(英文)[J]. 生物化学与生物物理进展, 2005(2): 187–191.
- [18] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25–29.
- [19] Rozen S, Skaletsky H J. Primer 3 on the WWW for general users and for biologist programmers[M]//Krawetz S, Misener S, Totowa, N J. Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology. Humana Press, 2000: 365–386.
- [20] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method[J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101–1108.
- [21] SAS Institute Inc. SAS procedures guide. Release 6.03 Edition[M]. North Carolina: SAS Institute Inc, 1988.
- [22] Thomas S, Poupin J. A study of the effects of water carbonate alkalinity on some parameters of blood acid-base status in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.)[J]. J Comp Physiol B, 1985, 156(1): 29–34.
- [23] Gossel G G, Wood C M, Laurent P, et al. Morphological responses of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill to hyperoxia, base (NaHCO_3) and acid (HCl) infusions[J]. Fish Physiol Biochem, 1994, 12(6): 465–477.
- [24] Jasmani S, Jayasankar V, Shinji J, et al. Carbonic anhydrase and Na/K-ATPase activities during the molt cycle of low salinity-reared white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. Fish Sci, 2010, 76(2): 219–225.
- [25] Carlson G M, Holyoak T. Structural Insights into the mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase catalysis [J]. J Biol Chem, 2009, 284(40): 27037–27041.
- [26] Hirata T, Kaneko T, Ono T, et al. Mechanism of acid adaptation of a fish living in a pH 3.5 lake[J]. Am J Physiol-Reg I, 2003, 284(5): R1199–R1212.
- [27] Racotta I S, Hernandez-Herrera R. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia[J]. Comp Biochem Phys A, 2000, 125(4): 437–443.
- [28] 朱奇, 陈彦. 溶菌酶及其应用[J]. 生物学通报, 1998(10): 11–12.
- [29] Yada T, Muto K, Azuma T, et al. Effects of acid water exposure on plasma cortisol, ion balance, and immune functions in the "cobalt" variant of rainbow trout[J]. Zool Sci, 2006, 23(8): 707–713.
- [30] Esbaugh A J, Perry S F, Bayaa M, et al. Cytoplasmic carbonic anhydrase isozymes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: comparative physiology and molecular evolution[J]. J Exp Biol, 2005, 208(10): 1951–1961.
- [31] T. Georgalis K M G J. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291: 407–421.
- [32] Breton S. The Cellular Physiology of Carbonic Anhydrases [J]. JOP, 2001, 2(4-suppl): 159–164.
- [33] Richards J G, Semple J W, Bystriansky J S, et al. Na^+/K^+ -ATPase (alpha-isoform) switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer[J]. J Exp Biol, 2003, 206(24): 4475–4486.
- [34] Palacios E, Bonilla A, Luna D, et al. Survival, Na^+/K^+ -ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-larvae[J]. Aquaculture, 2004, 234(1-4): 497–511.
- [35] Bystriansky J S, Richards J G, Schulte P M, et al. Reciprocal expression of gill Na^+/K^+ -ATPase alpha-subunit isoforms alpha 1a and alpha 1b during seawater acclimation of three salmonid fishes that vary in their salinity tolerance[J]. J Exp Biol, 2006, 209(10): 1848–1858.
- [36] Parra J E G, Baldisserotto B. Effect of water pH and hardness on survival and growth of freshwater teleosts[M]//Baldisserotto B, Mancera J M, Kapoor B G. Fish osmoregulation. Enfield: Science Publishers, 2007: 139.

Gene expression profiles of *Litopenaeus vannamei* in response to carbonate alkalinity stress

YAO Zongli^{1,2}, YING Chengqi¹, ZHOU Kai¹, WANG Hui¹, LAI Qifang¹

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Engineering Research Center for Saline-alkali Water Fisheries, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

Abstract: Saline-alkali water-bodies are common in China. Alkalinity stress is considered to be one of the primary stressors for shrimp in saline-alkali water. Thus, an improved understanding of the molecular response to alkalinity stress is critical for advancing the sustainability of shrimp culture. Our objective was to evaluate the effect of carbonate alkalinity on global gene expression in *Litopenaeus vannamei*, a species of shrimp that is cultured throughout the world. We constructed two subtractive cDNA libraries from the gills of shrimp that were exposed to either 20 mmol/L alkalinity water or control water for 4 days. Dot blot expression analysis revealed that 158 clones were up-regulated and 291 clones were down-regulated following exposure to alkalinity stress. These clones were subsequently sequenced and up to 100 genes were identified from the forward and reverse libraries, of which 50 were well annotated. These differentially expressed genes were divided into a number of biological gene ontology groups related to catalytic activity, cell, structural molecule activity, binding, transporter activity, reproduction, enzyme regulator activity, and cellular process. Ion transportation genes, such as carbonic anhydrase (*CA*) and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (*NKA- α*), were up-regulated while immune response genes (e.g., lysozyme) were down-regulated. We evaluated expression of two differentially expressed genes (*CA* and *NKA- α*) in the gills and antennal gland of shrimp prior to exposure and following exposure to 20 mmol/L carbonate alkalinity water for 1–9 d. Exposure to carbonate alkalinity resulted in an increase in *CA* mRNA and *NKA- α* mRNA expression in the gills and antennal gland. The majority of the increase occurred on day 1. Our results suggest that expression of carbonic anhydrase and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ genes plays an important role in the response to alkalinity stress in *L. vannamei*, particularly in the gill and antennal gland. To our knowledge, this is the first study to use shrimp SSH cDNA libraries to detect global gene expression alterations in response to alkalinity stress. Alkalinity stress stimulated ion regulated processes and slowed down the gene expression related to immune system and reproduction in *L. vannamei*. The alkalinity-regulated genes characterized in the present study may be convenient beginning points to study the molecular basis of alkalinity adaptation. The physiological role of these genes in environmental adaptation remains to be explored. Understanding how alkalinity triggers regulation of gene expression deserves further attention.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; alkalinity stress; gene expression; SSH; real-time PCR

Corresponding author: LAI Qifang. Tel: +86-21-65684655; E-mail: qifanglai@163.com