

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01043

细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞抑制性差减杂交文库构建及巨噬细胞表达蛋白 cDNA 的克隆与差异表达

任洪林^{1,2}, 徐丹丹¹, 乔琨¹, 蔡灵¹, 黄伟滨¹, 张鼐¹, 王克坚¹

1. 近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005;
2. 人兽共患病教育部重点实验室 吉林大学人兽共患病研究所, 长春 130062

摘要: 以雌性杂色鲍为对象, 以大肠杆菌、副溶血弧菌、溶壁微球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌的混悬液做为攻毒菌, 利用抑制性差减杂交(SSH)技术构建细菌攻毒的杂色鲍血淋巴细胞 SSH cDNA 文库。随机挑取生长菌落 110 个克隆子, 进行菌液 PCR 鉴定, 计算文库重组率为 98.18%, 文库容量为 1.37×10^6 pfu。将重组子测序, 经 BLAST 一致性搜索比对分析, 有一重组片段含有穿孔素(Perforin)保守结构域, 为巨噬细胞表达蛋白(MEP)类穿孔素部分 cDNA 序列, 片段大小为 1 551 bp, 连续编码 517 个氨基酸残基, 申请 GenBank 登录号为 EU272049。经半定量 PCR 和荧光定量 PCR 差异显示分析, 发现在细菌感染状态下 MEP 基因在血淋巴细胞中存在明显的上调表达现象。

关键词: 杂色鲍; 血淋巴细胞; 细菌; 抑制性差减杂交; 巨噬细胞表达蛋白; 类穿孔素; 差异表达分析

Construction of SSH library from haemocyte of variously colored abalone challenged with bacteria and differential expression analysis of macrophage expressed protein

REN Hong-Lin^{1,2}, XU Dan-Dan¹, QIAO Kun¹, CAI Ling¹, HUANG Wei-Bin¹, ZHANG Nai¹, WANG Ke-Jian¹

1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Key Laboratory of Zoonosis, Ministry of Education, Institute of Zoonosis, Jilin University, Changchun 130062, China

Abstract: Abalones are considered to be the most precious delicacy from the sea, and become very important commercial seafood in aquaculture worldwide. Variously colored abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846) has been widely cultured on the southeast coast for more than twenty years. However, abalone culture frequently suffers from bacterial infection and mass mortality of reared abalones causes serious economic losses. Unfortunately, knowledge of the defense mechanism in this animal is still lacking. In this study, using suppression subtractive hybridization (SSH) technology, a forward SSH library was constructed from haemocytes of *H. diversicolor*, with the content of 1.37×10^6 pfu and the recombinant rate of

收稿日期: 2008-01-02; 修回日期: 2008-04-04

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2007AA091406)资助[Supported by National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA091406)]

作者简介: 任洪林(1974-), 男, 山东海阳人, 讲师, 博士研究生, 研究方向: 分子生物学与分子毒理学。Tel: 0592-2187819; E-mail: renhl@yahoo.cn

通讯作者: 王克坚(1964-), 男, 山东诸城人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 分子生物学与分子毒理学。Tel: 0592-2184658; E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

98.18%. After the recombinant plasmids were sequenced, partial cDNA of macrophage expressed protein (MEP) was recognized based on BLAST searches in NCBI, with the size of 1 551 bp, and continuously encoding 517 amino acids. Semi-quantitative PCR and quantitative real-time PCR results showed that *MEP* cDNA was distinctly up-regulated in haemocytes of the bacterial-challenged group compared to the unchallenged group. The gene information obtained from this library will provide new insights into the immune mechanism of *H. diversicolor* and facilitate future study of target genes involved in the response to invading microorganisms.

Keywords: variously colored abalone (*Haliotis diversicolor*); haemocyte; bacteria; SSH; macrophage expressed protein; perforin-like; differential expression analysis

鲍属软体动物门、腹足纲、原始腹足目、鲍科,以其丰富的营养价值和鲜美的味道,被列为“海产八珍”之首,其市场价格高且稳定,故有“软黄金”的美誉,是我国重要的海水养殖经济贝类^[1]。杂色鲍 (*Haliotis diversicolor* Reeve, 1846)也有人称之为“九孔鲍”^[2],是我国南方鲍种,因其生长迅速,一直在南方沿海海域得到广泛的养殖。但近年来由于近海海域的污染和富营养化现象加重,加之养殖鲍种的自身退化,使得人工养殖的杂色鲍抗病力低,时有疫病发生。特别是在季节转换,水温变化的过程中,更易暴发疾病,给养鲍业带来大量的经济损失^[3]。

有多种因素影响养殖鲍的健康,致使发生疫病,例如不良条件应激^[4]、细菌性感染^[5]、病毒性感染^[6]等。相对脊椎动物而言,对鲍等无脊椎动物免疫研究,特别是免疫相关基因的研究,国内外报道较少。无脊椎低等动物免疫的一道重要防线就是细胞免疫。而血淋巴细胞在细胞免疫中起着至关重要的作用,主要参与细胞吞噬、炎症反应、化学趋化、细胞凝集、细胞黏附等过程^[7]。而贝类机体的免疫学参数也主要表现在血淋巴中的酚氧化酶、碱性磷酸酶、酸性磷酸酶等酶活性^[8]以及血淋巴细胞总数、呼吸突发、抗菌、溶菌等活力的高低^[9]。这些血淋巴细胞免疫功能的变化,与细胞内部分子水平基因转录表达的变化是分不开的。

抑制性差减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术^[10]是筛选不同条件下机体差异表达基因的强有力的工具,目前已经广泛应用在生物、医学、农业、环境科学等领域。鲍疫病的暴发带来大量经济损失,使我们充分意识到深入研究鲍免疫机制,筛选重要的免疫相关基因,以期提高鲍抗病力的重要性。本研究以雌性杂色鲍为对象,以大肠杆菌等 5 种细菌混悬液为攻毒菌,利用 SSH

技术,构建细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞差减 cDNA 文库,并从中随机筛选到杂色鲍巨噬细胞表达蛋白 perforin-like cDNA (*MEP*),通过半定量 PCR 和 Real-time PCR 技术进一步证实,该基因在细菌感染状态下,血淋巴细胞 *MEP* 存在着明显的上调表达。该文库的成功构建和 *MEP* cDNA 的克隆为筛选发现鲍免疫相关基因和进一步研究分子免疫机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

雌性杂色鲍 (*H. diversicolor*) 血淋巴细胞,杂色鲍购自福建漳浦养鲍场。

1.1.2 攻毒用菌种

两种革兰氏阴性菌:大肠杆菌 (*Escherichia coli* CGMCC 1.2389) 和副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus* CGMCC 1.1615); 3 种革兰氏阳性菌:金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* CGMCC 1.89), 溶壁微球菌 (*Micrococcus lysodeikticus* CGMCC 1.634) 和表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis* CGMCC 1.2429), 均购自中国科学院微生物研究所。

1.1.3 主要试剂

Trizol 总 RNA 提取试剂购自 Invitrogen 公司; Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit、PCR-SelectTM cDNA Subtraction kit 和 AdvantageTM 2 PCR kit 购自 Clontech 公司; Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、DL-2000 Marker、pMD18-T 载体连接试剂盒和 PrimerScriptTM RT-PCR kit (Perfect Real Time) 购自 TaKaRa 公司; Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems (ABI) 公司; 2 × PCR Taq Mix 购自广州东盛生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 处理与采样

将副溶血弧菌接种于 5 mL 海水肉汤 2216 培养基中 28 °C 培养过夜, 其他攻毒用菌接种于 5 mL LB 培养基中 37 °C 培养过夜。3 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 收集菌体, 分别用灭菌生理盐水稀释菌体至浓度 2×10^7 cfu/mL, 将 5 种细菌稀释液等体积混合, 作为注射用细菌贮液。

实验设细菌攻毒组和生理盐水对照组, 每组 10 只杂色鲍。细菌攻毒组每只鲍注射 25 μ L 细菌贮液 (5×10^5 cfu/鲍), 生理盐水对照组注射等体积的生理盐水。于鲍腹足部注射细菌后, 暂养 36~40 h, 使用 1 mL 无菌一次性注射器于围心腔无菌采集鲍血淋巴。分别将两组内各鲍血淋巴合并, 每组总体积约 500 μ L, 800 r/min 4 °C 离心 10 min, 弃上清, 收集沉淀血淋巴细胞, 迅速放入液氮中。

1.2.2 抑制性差减杂交 cDNA 文库的构建

按照 Trizol 操作手册提取血淋巴细胞总 RNA, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光法检测总 RNA 质量和含量。按照 Super SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit 操作手册分别将 1 μ g 攻毒组和生理盐水对照组总 RNA 合成 SMART PCR cDNA。按照 PCR-SelectTM cDNA Subtraction kit 操作手册构建细菌攻毒杂色鲍血淋巴细胞 SSH cDNA 文库。设细菌攻毒组 cDNA 为差减杂交实验的 Tester 组, 生理盐水对照组 cDNA 为差减杂交实验的 Driver 组, 经过两次差减杂交和两次抑制性 PCR, 将差异 PCR 产物与 pMD18-T 克隆载体连接, 转化至大肠杆菌 X-blue 感受态中, 涂布于氨苄抗性 LB 平板, 37 °C 培养过夜。

1.2.3 SSH 文库初步鉴定和 MEP 基因的筛选

随机挑取 110 个生长菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜。使用 M13(-47)、M13(-48)引物和 2 \times PCR Taq Mix 构建 PCR 体系, 进行重组质粒的菌液 PCR 鉴定。反应条件: 94 °C 破碎菌体 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 3 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 计算文库中插入片段大小分布及重组率。

将重组质粒送上海生工生物工程技术服务公司测序, 将测序结果使用 DNASTAR 7.0 分析, 去除载体和衔接头序列, 并翻译成氨基酸序列, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 网站上, 利用 BLAST 工具分别进行 BLASTn 和 BLASTp 序列相

似性搜索, 发现有一序列为鲍巨噬细胞表达蛋白 (Macrophage expressed protein, MEP) 的 cDNA。将 MEP 登录 GenBank, 申请基因序列号。

1.2.4 半定量 PCR 法和 Real-time PCR 法验证 MEP 表达差异

合成 MEP 特异引物(上游引物 5'-CAAGACGG-ACCAAGCCCGCTATGAT-3' 和下游引物 5'-AACACCAGCAGGAGTGACAAGAGT-3'), 扩增片段长度为 771 bp。以杂色鲍持家基因 *actin* (GenBank 登录号: EF587284) 作为内参基因, 合成 *actin* 引物(上游引物 5'-ACGGGTATTGTTCTTGACTCTGGTG-3' 和下游引物 5'-TTTCTCCTTGATGTCCTGACGATT-3'), 扩增片段长度为 201 bp。

用半定量 PCR 法, 以 Ex Taq DNA 聚合酶分析构建 SSH cDNA 文库的攻毒组和生理盐水对照组的 SMART PCR cDNA 中 MEP 基因转录差异。半定量 PCR 体系: 5 ng 模板 cDNA, 0.375 μ L dNTP mix (10 mmol/L), 0.625 U Ex Taq, 2.5 μ L 10 \times Ex Taq buffer (Mg²⁺ plus), 上下游引物各 25 pmol, 总体积 25 μ L。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 1 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 复性 40 s, 72 °C 延伸 40 s, 进行 26 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 分析 MEP 基因表达差异。

用荧光定量 Real-time PCR 法, 分析细菌攻毒 36~40 h 杂色鲍血淋巴细胞 MEP 基因表达差异。使用 Trizol 试剂提取该时间段细菌攻毒组和生理盐水对照组血淋巴细胞总 RNA, 按照 PrimerScriptTM RT-PCR kit 操作手册合成相应的 cDNA。使用 Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (ABI) 试剂和 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) 分析 MEP 基因的差异表达。Real-time PCR 体系: 1 ng 总 RNA 反转录的 cDNA, 上下游引物各 5 pmol, 10 μ L Power SYBR Green PCR Master Mix, 总体积为 20 μ L。反应条件: 95 °C 激活 DNA 聚合酶 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 复性 25 s, 72 °C 延伸 40 s, 进行 40 个循环。随后做 PCR 产物的溶解曲线分析产物的特异性。使用 7500 system SDS software version 1.3.1.21 软件分析 MEP 基因相对内参 *actin* 基因的差异表达 RQ 值 (Relative quantification)。

2 结果与分析

2.1 抑制性差减杂交 cDNA 文库的合成

2.1.1 杂色鲍血淋巴细胞 SMART PCR cDNA 的合成

1.5% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定血

淋巴细胞总 RNA 的质量和浓度: 生理盐水对照组总 RNA 浓度为 $1.935 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.93; 细菌攻毒组总 RNA 浓度为 $2.053 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, A_{260}/A_{280} 为 1.97。

分别取 $1 \mu\text{g}$ 的细菌攻毒组和生理盐水对照组总 RNA, 经实验确定的 23 个最适 PCR 循环扩增后, 得到差减杂交实验所需的两组 SMART PCR cDNA。以细菌攻毒组 cDNA 做为 Tester, 生理盐水对照组 cDNA 做为 Driver, 经两次杂交和两次抑制性 PCR, 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 差减后建库用 cDNA 与未差减组差异明显(图 1)。

2.1.2 SSH cDNA 文库的构建和鉴定

取 $0.74 \mu\text{g}$ 差减后经二次抑制性 PCR 的 Tester DNA, 构建 SSH cDNA 文库。根据生长菌落数及菌液 PCR 鉴定结果推算文库的重组率为 98.18%; 克隆效率为 $1.86 \times 10^6 \text{ cfu}/\mu\text{g}$ Tester DNA; 文库容量为 $1.37 \times 10^6 \text{ cfu}$ 。重组质粒中插入片段大小分布为 1 000 bp 以上 19 个, 占 17.59%; 1 000~500 bp 66 个, 占 61.11%; 500 bp 以下 23 个, 占 21.30% (图 2)。

2.2 MEP 部分基因序列和预测的氨基酸序列及其基因转录水平差异显示分析

重组质粒送样测序, 经 DNASTAR 生物软件和 BLAST 工具分析, 发现有一重组片段为巨噬细胞表达蛋白(MEP)部分 cDNA (图 3), 片段大小 1 551 bp, 连续编码 517 个氨基酸残基, GenBank 登录号为 EU272049。Blastn 结果显示, 与杂色鲍(*H. diversicolor*

supertexta) 巨噬细胞表达基因 *mpeg* (GenBank 登录号: EF529460) 一致性为 98%; 与加利福尼亚红鲍(*H. rufescens*) 和粉鲍(*H. corrugata*) 的 *abMpeg1* cDNA (GenBank 登录号: AY485641 和 AY485640) 一致性均为 88%。Blastp 搜索结果, 首先搜索到穿孔素(Perforin) 保守结构域膜攻击复合体/穿孔素 MACPF (NCBI 保守结构域数据库 CDD 登录号: smart00457), 与杂色鲍

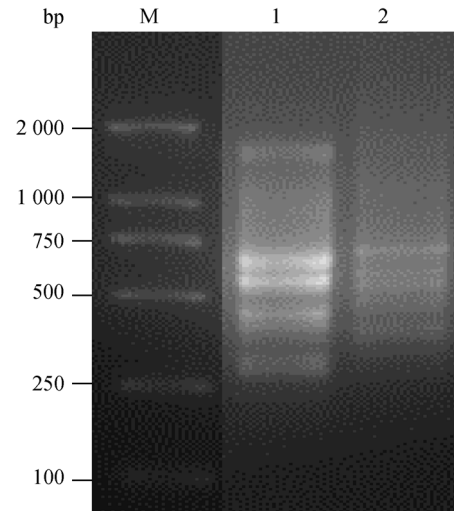


图 1 差减后与未差减 cDNA 经第二次抑制性 PCR 差异显示电泳图

M: DL2000 marker; 1: $10 \mu\text{L}$ 差减后经二次抑制性 PCR 的 Tester DNA; 2: $8 \mu\text{L}$ 未差减经二次抑制性 PCR 的 Tester DNA。

Fig. 1 Differential display of subtracted and unsubtracted Tester DNAs after the secondary suppression PCR

M: DL2000 marker; 1: Subtracted Tester DNAs; 2: Unsubtracted Tester DNAs.

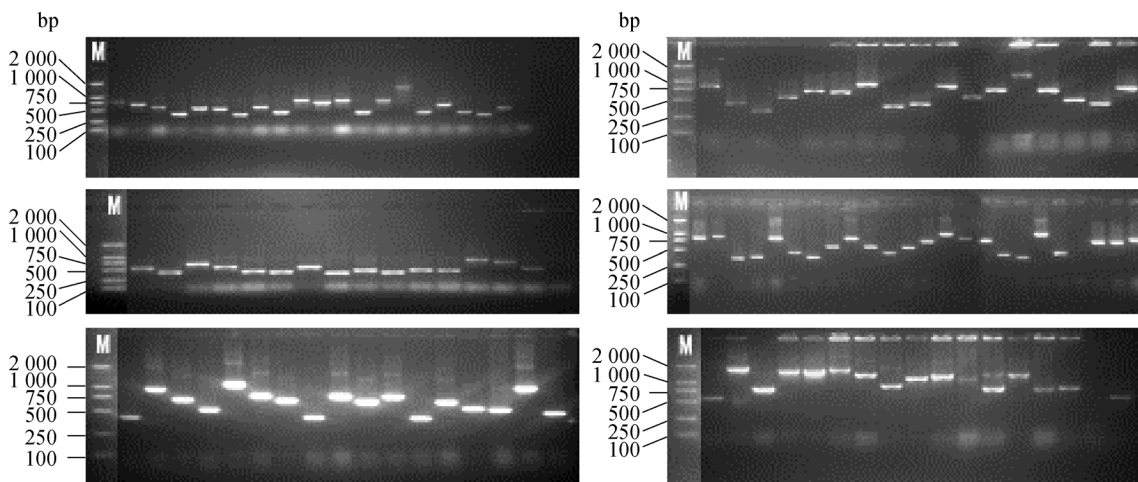


图 2 SSH 文库重组质粒的 PCR 鉴定

M: DL2000 marker; 其他泳道为重组质粒 PCR 鉴定的产物。

Fig. 2 Identification of recombinant plasmids from SSH library

M: DL2000 marker; The other: PCR products of the recombinant plasmid identification.

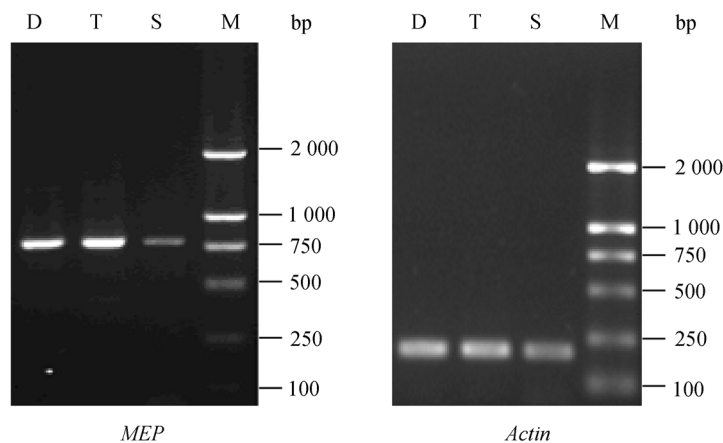


图 4 半定量 PCR 分析 *MEP* 基因在细菌攻毒组和生理盐水对照组鲍血淋巴细胞 SMART PCR cDNA 中差异表达
D: 生理盐水对照组; T: 细菌攻毒组; S: 扩增 *MEP* 或 *actin* 基因标准对照; M: DL2000 marker。

Fig. 4 Differential expression patterns of the *MEP* gene between the bacterial-challenged group and the unchallenged group by semi-quantitative PCR

D: The unchallenged group; T: The bacterial-challenged group; S: The standard PCR product of the *MEP* or *actin* genes; M: DL2000 marker.

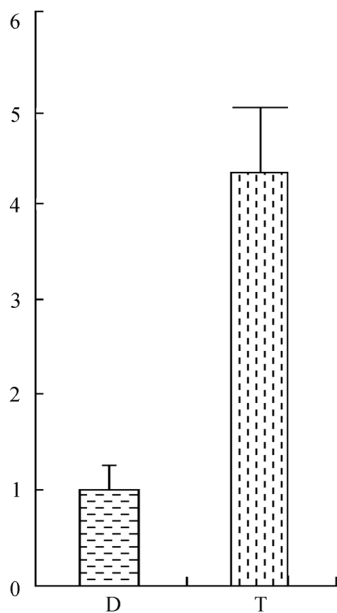


图 5 相对定量 Real-time PCR 分析 *MEP* 基因在细菌攻毒组和生理盐水对照组鲍血淋巴细胞中差异表达
纵坐标: *MEP* 基因相对于持家基因 *actin* 的表达量(RQ 值);
横坐标: 实验各组别; D: 生理盐水对照组; T: 细菌攻毒组。

Fig. 5 Differential expression patterns of the *MEP* gene between the bacterial-challenged group and the unchallenged group by relatively quantitative real-time PCR

Y-axis: The raw relative quantification (RQ) of *MEP* compared to house-keeping gene *actin*; X-axis: The experimental groups; D: The unchallenged group; T: The bacterial-challenged group.

(*H. diversicolor supertexta*, ABP96718)、红鲍(AAR82936)和粉鲍(AAR82935) *mepg* 基因的氨基酸序列一致性分别为 97%、91%和 91%。半定量 PCR 和荧光定量 PCR

结果均显示在混合细菌注射杂色鲍 36~40 h 时, *MEP* 基因在攻毒组鲍血淋巴细胞中, 存在着明显的相对于生理盐水对照组的基因上调表达(图 4 和图 5)。

3 讨论

3.1 血淋巴细胞 SSH 文库构建

生物体不同组织和不同生理状态下 cDNA 文库的构建及相关特异基因的筛选, 无疑是获得新功能基因的有效方法。自 Diatchenko 等^[10]于 1996 年报道了 SSH 技术以来, 已经成功应用于多种动物^[11]、植物^[12]和微生物^[13]的差异表达 mRNA 及基因组 DNA 的比较研究中。细菌感染是主要的免疫事件之一, 国内外研究鲍免疫相关基因的报道较少。王艺磊等^[14]报道了副溶血弧菌攻毒状态下杂色鲍肝胰腺 cDNA 文库的构建, 郑明刚等^[15]构建了鳃弧菌攻毒状态下皱纹盘鲍的肝胰腺和肾脏的 cDNA 文库, 并进行了免疫相关基因的筛选工作。在软体动物免疫系统血淋巴细胞发挥着重要免疫防御功能, 本研究首次利用 SSH 技术构建了杂色鲍细菌攻毒状态下血淋巴细胞 cDNA 差减文库, 并利用 SMARTTM PCR 技术合成 cDNA, 保证了合成的 cDNA 片段较长, 且理论上包含有大部分的全长 cDNA 序列, 以及获得的 cDNA 量大, 更利于下步差减杂交实验的操作, 从而保证了 SSH cDNA 文库高质量的成功构建^[16]。文库插入片段长度的鉴定分析实验(图 2), 结果显示有 17.59% 的重组质粒插入片段大于 1 000 bp,

61.11%插入片段在 500~1 000 bp, 说明文库中包含有较多较长的 cDNA 片段。差减杂交后 Test cDNA 与未差减的 Test cDNA 差异明显(图 1), 说明细菌攻毒组 cDNA 与生理盐水对照组 cDNA 成功进行差减扣除, 由此构建的文库将包含有更多的差异表达基因。推算文库总容量为 1.37×10^6 cfu, 达到了衡量文库质量要求的克隆子数^[17], 文库中包含基因信息较全, 可以用于较为全面、大量的基因筛选。

3.2 杂色鲍 MEP cDNA 的同源性分析

Mah 等^[18]于 2004 年报道了加利福尼亚红鲍和粉鲍的 *abmpegl* cDNA, 其翻译产物是类穿孔素(Perforin)蛋白。通过序列一致性比对分析, 发现我们克隆得到的杂色鲍 MEP cDNA 与红鲍和粉鲍的 *abmpegl* cDNA 核酸序列一致性为 88%, 推导的蛋白序列一致性为 91%。在保守结构域的一致性搜索分析中, 发现了典型的膜攻击复合体/穿孔素保守结构域, 更表明该基因编码鲍穿孔素蛋白。张克烽^[19]报道了杂色鲍(*H. diversicolor supertexta*) *mpegl* cDNA 的全长序列(GenBank 登录号: EF529460), cDNA 全长 2 781 bp, 编码 728 个氨基酸, 与我们克隆的杂色鲍(*H. diversicolor*)部分 MEP cDNA 的基因一致性高达 98%、氨基酸序列的一致性高达 97%。微小的基因和蛋白一致性的差别, 一方面可能是由个体之间差异引起; 另一方面, *H. diversicolor supertexta* 曾一度被认为是杂色鲍(*H. diversicolor*)的一个亚种九孔鲍, 但随着分子生物学手段在物种亲缘关系鉴定方面的成熟应用, 现在被学者广为接受的观点是, 九孔鲍(*H. diversicolor supertexta*)与杂色鲍(*H. diversicolor*)的亲缘关系趋异性较小, 不能达到亚种的差别, 只能在同一种不同地理群体层面上做以区别^[20], 种属拉丁名均为 *H. diversicolor*。因此不同地理群体可能也造成了这两个基因的微小差别。

3.3 杂色鲍 MEP 基因差异表达分析

由于假阳性的存在, 从 SSH 文库中筛选到的基因一般均需要进一步进行基因差异表达分析的验证。本研究筛选到 MEP 基因, 并同时通过半定量 PCR 和 Real-time PCR 两种基因差异显示分析方法, 证明细菌攻毒可诱导血淋巴细胞上调表达 MEP 基因。已知细胞毒性淋巴细胞的细胞外颗粒分泌途径, 在免疫系统发挥免疫监视和保持免疫功能平衡方面发挥着重要作用。破膜蛋白穿孔素 perforin 是该细胞外分泌颗粒的主要成分之一, 通常它可能通过两

种方式发挥杀死目标细胞的功能。它可以直接在目标细胞膜上形成孔洞, 以便粒酶进入目标细胞内, 从而杀死细胞。另一方面, 它可破坏目标细胞内涵体, 使目标细胞内源性的粒酶释放到细胞内, 而后引起细胞凋亡^[21]。Mah 等^[18]通过 Southern blot 和 Northern blot 方法分析, 发现该基因为单拷贝基因且没有内含子, 在血淋巴细胞、上足和鳃中存在着大量表达, 并推测其在组织滞留血淋巴细胞中的表达量要高于在循环血中血淋巴细胞内的表达量。有研究表明在副溶血弧菌感染 8 h 和 96 h, 该基因在胰腺腺细胞中存在着明显的上调表达^[19], 这些都进一步说明该基因在鲍免疫功能中的重要性。

参考文献(References):

- [1] LI Tai-Wu, SU Xiu-Rong, DING Ming-Jin, SONG Lin-Sheng, LIU Bao-Zhong. Abalone Biology. Beijing: Science Press, 2004.
李太武, 苏秀榕, 丁明进, 宋林生, 刘保忠. 鲍的生物学. 北京: 科学出版社, 2004.
- [2] Wang ZY, Ho KC, Yu DH, Ke CH, Mak WY, Chu KH. Lack of genetic divergence in nuclear and mitochondrial DNA between subspecies of two Haliotis species. *J Shellfish Res*, 2004, 23(4): 1143-1146.
- [3] Cai J, Wang Z, Cai C, Zhou Y. Characterization and identification of virulent *Klebsiella oxytoca* isolated from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. *J Invertebr Pathol*, 2008, 97(1): 70-75.
- [4] Cheng W, Li CH, Chen JC. Effect of dissolved oxygen on the immune response of *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 2004, 232(1-4): 103-115.
- [5] Liu PC, Chen YC, Lee KK. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* isolated from diseased small abalone, *Haliotis diversicolor supertexta*. *Microbios*, 2001, 104 (408): 71-77.
- [6] Hooper C, Hardy-Smith P, Handler J. Ganglioneuritis causing high mortalities in farmed Australian abalone (*Haliotis laevis* and *Haliotis rubra*). *Aust Vet J*, 2007, 85(5): 188-193.
- [7] Hooper C, Day R, Slocombe R, Handler J, Benkendorff K. Stress and immune responses in abalone: limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish Shellfish Immunol*, 2007, 22(4): 363-379.
- [8] WANG Shu-Hong, WANG Yi-Lei, ZHANG Zhao-Xia, WENG Chao-Hong, ZOU Zhi-Hua, ZHANG Zi-Ping. Activities of selected enzymes in cell free haemolymph from abalone (*Haliotis diversicolor*) injected with *E.coli* or *Vi-*

- brío parahemolyticus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(1): 37–40.
- 王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 翁朝红, 邹志华, 张子平. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力的影响. *中国水产科学*, 2004, 11(1): 37–40.
- [9] Cheng W, Hsiao IS, Chen JC. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor ssp. pertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 17(3): 193–202.
- [10] Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(12): 6025–6030.
- [11] Dios S, Poisa-Beiro L, Figueras A, Novoa B. Suppression subtraction hybridization (SSH) and microarray techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. *Mol Immunol*, 2007, 44(9): 2195–2204.
- [12] YUAN Xiao-Meng, ZHOU Yun-Tao, ZHANG Hong-Yan, XUE Hua, ZHOU Lin, ZHAO Yun. Identification and expression analysis of a full-length cDNA encoding *Brassica napus* small nuclear ribonucleoprotein BnSmD1. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(12): 1525–1528.
- 袁晓萌, 周云涛, 张红岩, 薛华, 周琳, 赵云. 甘蓝型油菜小核糖核蛋白 BnSmD1 编码区全长 cDNA 的克隆与表达分析. *遗传*, 2007, 29(12): 1525–1528.
- [13] Wang X, Zhou D, Qin L, Dai E, Zhang J, Han Y, Guo Z, Song Y, Du Z, Wang J, Wang J, Yang R. Genomic comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* by combination of suppression subtractive hybridization and DNA microarray. *Arch Microbiol*, 2006, 186(2): 151–159.
- [14] WANG Yi-Lei, ZHANG Zi-Ping, DAI Jun, ZOU Zhi-Hua, WANG Shu-Hong. Construction of liver full-length cDNA libraries of abalone *Haliotis diversicolor* infected with *Vibrio parahaemolyticus* for 12 h and 24 h. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2004, 11(3): 190–195.
- 王艺磊, 张子平, 戴军, 邹志华, 王淑红. 副溶血菌感染 12 h 和 24 h 杂色鲍肝脏全长 cDNA 文库的构建. *中国水产科学*, 2004, 11(3): 190–195.
- [15] ZHENG Ming-Gang, SUN Xiu-Qin, ZHANG Jin-Qing. Construction of cDNA library of liver and kidney from abalone (*Haliotis discus Hannai*) and preliminary analysis of immune gene. *Chinese High Technology Letters*, 2007, 17(3): 319–324.
- 郑明刚, 孙修勤, 张进兴. 皱纹盘鲍肝和肾 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的初步分析. *高技术通讯*, 2007, 17(3): 319–324.
- [16] Zhu YY, Machleder EM, Chenchik A, Li R, Siebert PM. Reverse transcriptase template switching: a SMART™ approach for full-length cDNA library construction. *Bio-Techniques*, 2001, 30(4): 892–897.
- [17] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Clone: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995.
- J. 撒姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著(金冬雁, 黎孟枫等译, 侯云德等校). *分子克隆实验指南(第二版)*. 北京: 科学出版社, 2002.
- [18] Mah SA, Moy GW, Swanson WJ, Vacquiera VD. A perforin-like protein from a marine mollusk. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 316(2): 468–475.
- [19] ZHANG Ke-Feng. Cloning and analysis of *sod*, *cat* and *mpeg* gene from small abalone *Haliotis diversicolor ssp. pertexta* [Dissertation]. Xiamen: Jimei University, 2007.
- 张克烽. 杂色鲍 *sod*、*cat* 和 *mpeg* 基因的克隆和分析[学位论文]. 厦门: 集美大学, 2007.
- [20] WANG Zhi-Yong, KE Cai-Huan, WANG Yi-Lei, HO Ka-Chai, CHU Ka-Hou. Studies on genetic relationships between *Haliotis diversicolor* and *H. discus* using AFLP fingerprinting and DNA sequence analysis. *Chinese High Technology Letters*, 2004, 12(12): 93–98.
- 王志勇, 柯才焕, 王艺磊, 何家齐, 朱嘉濠. 从 AFLP 指纹和标记基因序列看我国养殖的四种鲍的亲缘关系. *高技术通讯*, 2004, 12(12): 93–98.
- [21] Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(12): 940–952.