

# 应用 cDNA 微阵列芯片技术筛选猪蛔虫性别差异表达基因的研究

邹丰才, 吴绍强, 廖申权, 林瑞庆, 李明伟, 宋慧群, 黄翠琴, 朱兴全\*

(华南农业大学兽医学院, 广州 510642)

**摘要:** 采用 cDNA 微阵列芯片技术, 从所构建的猪蛔虫雌、雄成虫 cDNA 消减文库分别挑取 1 044 和 1 119 个克隆, PCR 扩增其插入片段, 经纯化后点样于预先处理好的基片上(双点杂交), 制备成 cDNA 微阵列芯片。将分别标记荧光素 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 的雌虫和雄虫 cDNA 探针, 与制备好的 cDNA 芯片杂交(平行进行反标杂交试验)。根据每个点杂交后的 Ratio 值, 筛选出双点杂交和正反标中都同时具有表达差异的基因克隆共 1 559 个。将表达差异最明显的前 831 个克隆进行测序, 获得 720 个有效序列, 经生物信息学分析发现, 雄虫特异表达的主要精子蛋白和雌虫特异表达的卵巢信息蛋白的基因序列多数与新杆属线虫存在同源性, 有 31 个可能是新的 ESTs。性别差异表达基因及其相关生物信息的获得为下一步研究基因功能奠定了基础。

**关键词:** 猪蛔虫; cDNA 微阵列芯片; 性别特异基因; 表达谱分析

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)02-0163-05

## Profiling and Identification of Gender-specific Expressed Genes in *Ascaris suum* by cDNA Microarray Analysis

ZOU Feng-cai, WU Shao-qiang, LIAO Shen-quan, LIN Rui-qing,

LI Ming-wei, SONG Hui-qun, HUANG Cui-qin, ZHU Xing-quan\*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Gender-specific gene expression in *Ascaris suum* was investigated by cDNA microarray analysis. A total of 2 163 clones (1 044 female and 1 119 male) were selected from the male and female *A. suum* cDNA libraries constructed using the technique of suppression subtractive hybridization (SSH). Insert fragments of them were amplified by PCR, the PCR products were then purified and robotically printed onto aminosilane-coated glass slides, and each clone was spotted twice in the same slide. The cDNA arrays were hybridized with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP fluorescent-labeled probes from female and male cDNA, respectively. A “dye-swap” experiment was performed simultaneously. The hybridization signal of each spot was measured, normalized, and expressed as a Ratio. In total, 1 559 clones were identified which showed differential expression for each of the four signal values (for the two repeats and the two dye swaps) according to their Ratios (Ratio=Cy5/Cy3\*, less 0.5 or more 2). Expression profiling revealed that 831 of these clones were considered to be significantly differentially expressed, and then were sequenced. A total of 720 valid ESTs were obtained and 31 of which were considered to represent new genes.

收稿日期: 2005-06-06

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目(30225033); 人事部留学回国人员科技活动择优资助项目; 广东省自然科学基金重点项目(36835); 广东省科技计划项目(2004B50201020)

作者简介: 邹丰才(1976-), 男, 四川人, 博士生, 主要从事寄生虫功能基因组学研究

\* 通讯作者: 朱兴全(1963-), 男, 四川省什邡市人, 教授, 主要从事寄生虫分子生物学的研究。Tel: 020-85283730; 13380055552; Fax: 020-85280234; E-mail: xingquanzh@scau.edu.cn

ESTs representing genes encoding male-specific major sperm proteins (MSPs) and female-specific ovarian message proteins were abundant and showed significant homology to those of *Caenorhabditis*. Identification of gender-specific genes provides foundation for further studies on the potential functions of key gender-specific genes.

**Key words:** *Ascaris suum*; cDNA microarray; gender-specific gene; expression profiling analysis

寄生性线虫对养殖业造成了巨大的危害<sup>[1,2]</sup>。药物防治因其残留和耐药性等问题而逐渐受到限制。从寄生线虫自身的生殖发育调控机制入手,通过阻断或干扰其生殖发育的某一个或多个关键阶段,可以达到控制寄生线虫病的目的。目前这方面的研究主要集中在鉴定并阐明和线虫性别相关的基因,即这些基因在雌、雄成虫或不同幼虫期的表达情况及其功能推测<sup>[3~8]</sup>。

基因芯片自问世并取得国际专利以来,以其高通量,大规模,快速平行化等特点,为功能基因组学的研究提供了良好的技术平台<sup>[9,10]</sup>。当第一篇表达谱基因芯片相关文章在 Science 杂志发表后<sup>[11]</sup>,该技术在筛选差异表达基因等方面呈现出强大的功效并得以更广泛地应用<sup>[12~15]</sup>。本研究选择严重危害养猪业的猪蛔虫作为研究模型,从所构建的猪雌雄蛔虫消减 cDNA 文库中挑取克隆,制作成 cDNA 微阵列表达谱基因芯片,筛选性别表达差异基因,并通过大量 ESTs 测序及序列对比分析,以获取相关的生物信息,为下一步采用 RNA 干扰等技术进一步研究关键基因功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 猪蛔虫成虫收集、总 RNA 的提取与 mRNA 的分离纯化

猪蛔虫成虫采自广东省某屠宰场,经鉴定雌雄后,采用 TriPure™ Isolation Reagent (Roche) 试剂盒分离得到总 RNA,测定其含量;并经热稳定试验 70 °C 保温 1 h 后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 28 S、18 S 条带有无变化。取约 2 mg 总 RNA,按 Poly (A) Purist™ 试剂盒 (Ambion) 程序,进行 mRNA 的分离纯化,−86 °C 保存备用。

### 1.2 cDNA 芯片的制备

分别从所构建的猪蛔虫雌、雄成虫性别特异 cDNA 消减文库(文库构建及其特异性检测见文献<sup>[16]</sup>)中随机挑取白斑单菌落,以通用引物 T7 和 SP6 进行 PCR 扩增,电泳鉴定后选出合格的阳性克隆(雄虫 1 119 个,雌虫 1 044 个)。提取每个菌样的

质粒,再以质粒为模板,PCR 扩增和纯化(QIAquick 96 PCR Purification Kit, Qiagen),使其在点样前的浓度达到 500 ng/μL。

根据设计好的矩阵,用自动点样仪 (Prosyst-5510A, Cartesian) 将纯化好的雄、雌 PCR 产物点样于预先处理好的氨基硅烷化基片上,形成雄、雌间隔排列的矩阵。每个克隆在同一个基片不同位置重复点样一次(双点杂交),以水稻基因作为阳性对照,超纯水作为阴性对照。平行点样多块基片。点完样后再水合 2 h (22~25 °C, 湿度为 65%~70%)、紫外交联(254 nm, 0.27 J/cm<sup>2</sup>)、室温过夜、浸入 0.1% SDS 2 次,每次 5 min,再用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤 2 次、自然干燥、质检,合格的基片放 4 °C 保存备用。

### 1.3 探针的标记与杂交

1.3.1 预杂交 待预杂交的基片放入 95 °C 水浴中变性 30 s, 然后立即放入无水乙醇中 30 s, 晾干。再将经 95 °C 水浴处理 2 min 的预杂交液加到基片的点样区域, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42 °C 预杂交 5~6 h。

1.3.2 探针标记 将分离纯化的雌、雄蛔虫 mRNA 在反转录合成 cDNA 过程中分别掺入荧光物质 Cy3-dUTP(绿色)和 Cy5-dUTP(红色)。本试验还进行了 1 次反标, 即雌、雄蛔虫探针分别标记 Cy5-dUTP 和 Cy3-dUTP。

1.3.3 杂交 将标记好的探针和待杂交基片分别在 95 °C 变性 2 min 和 30 s, 探针取出后迅速置于冰上; 基片取出浸入无水乙醇 30 s。将探针加在基片点样区域上, 用盖玻片覆盖, 放入杂交舱中, 用 Parafilm 密封, 在 42 °C 杂交箱中杂交过夜(16~18 h)。按同样的程序将反标的探针与另一平行的基片进行杂交试验。

### 1.4 芯片的扫描和数据的读取分析

芯片杂交结束后, 洗涤晾干, 用 Scanarray4000 扫描仪获取原始信号, 用芯片图像分析软件 (QuantArray) 进行数据均一化处理, 并计算每个点杂交后不同荧光物质标记所得信号比值, 即 Ratio = Cy5/Cy3 值, Ratio 值在 0.5~2 范围外视为表达存在差

异。

芯片制作和数据采集由上海博星基因芯片公司 (BioStar) 协助完成。

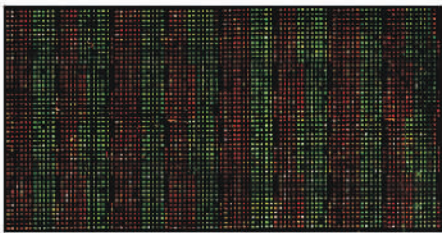
### 1.5 测序及 EST 序列比较分析

根据所得 Ratio 值, 筛选出双点杂交和正反标中都同时具有表达差异的基因克隆进行测序, 将所测的有效 ESTs 序列与 GenBank 数据库进行同源性对比分析, 以获得每个克隆的生物信息。

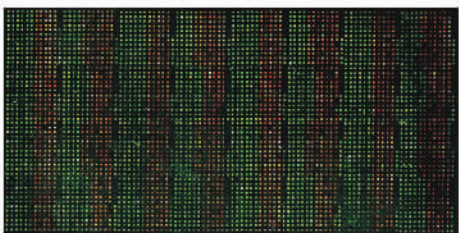
## 2 结 果

### 2.1 cDNA 芯片的制备和杂交

分别将雌、雄虫 1 044 个和 1 119 个克隆经扩增纯化后, 以间隔排列的矩阵点样在氨基硅烷化处理过的基片上, 与标记的探针杂交。正反两次标记杂交形成的原始信号图分别见图 1 (图 A 和图 B)。由于 Cy3-dUTP (简称 Cy3) 荧光信号和 Cy5-dUTP (简称 Cy5) 荧光信号分别显示绿色和红色, 对于某一点的两种叠加荧光信号, 如果 Cy3 信号较强, 该点多显绿色 (呈下调趋势); 如果 Cy5 信号较强, 该点多显红色 (呈上调趋势); 如果强度相似, 显示黄色。



A. 雌虫标记探针 Cy3, 雄虫探针标记 Cy5  
A. Cy3-labeled (green) from female,  
Cy5-labeled (red) from male



B. 雄虫探针标记 Cy3, 雌虫探针标记 Cy5  
B. Cy3-labeled (green) from male,  
Cy5-labeled (red) from female

图 1 猪蛔虫雌雄成虫 cDNA 基因芯片杂交信号

Fig 1 cDNA microarray for male and female of *Ascaris suum*

### 2.2 cDNA 芯片数据的处理和性别特异基因的筛选

芯片杂交扫描后, 用分析软件对芯片所获得的原始信号进行整体校准和数据均一化处理。均一化处理依据以下 2 个原则筛选有效基因点: 第一, 该基因点的 Cy3、Cy5 信号值皆大于 200, 或者其中之一大于 800; 第二, 该基因点的 Ratio 值在 0.1~10 之间, 然后求出  $r = \ln(\text{Ratio})$ , 再算出全部有效基因点  $r$  的平均值  $R$ , 试验的均一化系数就等于  $R$  的倒数即 EXP ( $R$ )。本试验中正反标均一化系数分别为 0.951、0.700, 所有基因点的 Cy3 信号值乘上均一化系数, 得出调整后的  $\text{Cy3}^*$ , 计算每个基因点在本试验中的表达差异值  $\text{Ratio} = \text{Cy5}/\text{Cy3}^*$ 。根据这个比值, 筛选出 Ratio 大于 2 或小于 0.5 的基因点。在正反芯片上 (双点杂交) 的一对基因中, Ratio 都存在表达差异的基因克隆雌虫有 748 个, 雄虫有 957 个; 反标芯片上一对基因中 Ratio 都存在表达差异的雌、雄基因克隆分别有 816 和 926 个。正反标都同时具有表达差异的基因克隆 (即一个克隆, 有 4 个信号值) 共 1 559 个, 其中雌虫有 702 个, 雄虫有 857 个。这些数据所代表的基因在与两种探针杂交时表现出较大的差异, 且上下调趋势一致, 程度相似。

### 2.3 测序及 ESTs 序列分析

筛选出双点杂交和正反标芯片上都同时具有表达差异, 且表达差异最明显的前 831 个克隆 (雌虫 392, 雄虫 439) 进行单向 5' 端测序, 除去重叠群 ESTs 外, 雌、雄虫分别获得 350 和 370 个 (共 720 个) 有效序列。经生物信息学分析 (BLASTn 和 tBLASTn), 与新杆属线虫 (*Caenorhabditis elegans* 和 *Caenorhabditis briggsae*) 进行同源性比较, 结果见表 1。以  $\text{score} \leq 100$ ,  $\text{Identity} \leq 50\%$ , 并且在数据库中没的 ESTs 定为新基因, 经过分析发现 31 个是新的 ESTs。

## 3 讨 论

从构建的猪蛔虫雌雄成虫 cDNA 消减文库中挑取基因克隆, 应用表达谱基因芯片技术进一步筛选, 获得了性别差异表达基因。这种将抑制消减杂交和基因芯片技术有效结合筛选差异表达基因的方法<sup>[17]</sup>, 克服了传统上采用的差显技术通量小等缺点<sup>[18]</sup>, 而且可以平行化大规模分析基因之间的表达差异。另外, 试验研究采用先制作基因芯片, 根据表

达谱分析结果,再进行有目的大量 ESTs 测序,这就避免了先大量测序再做芯片带来的巨大测序费用开

支<sup>[4]</sup>。

表 1 猪雌雄蛔虫性别特异 ESTs 与新杆属线虫同源性比较

Table 1 Comparative analysis of *A. suum* gender-specific ESTs with homologues in *Caenorhabditis*

与新杆属线虫同源的 ESTs 功能 Function of <i>Caenorhabditis</i> homologues	与雄虫同源的 ESTs 数量 Number of homologues for male specific ESTs	与雌虫同源的 ESTs 数量 Number of homologues for female specific ESTs
主要精子蛋白(MSP) Major sperm protein	27	—
免疫抑制卵巢信息蛋白 Immunosuppressive ovarian message protein	—	30
卵黄源蛋白 ( <i>vit</i> ) Vitellogenins	—	25
睾丸 $\beta$ -丙酮酸脱氢酶 Pyruvate dehydrogenase testis-specific beta	11	—
超氧化歧化酶 Manganese superoxide dismutase	10	21
蛋白激酶/磷酸酶 Protein kinases /phosphatases	19	10
其它蛋白/酶 Other proteins/enzymes	21	17
功能不清 Unknown function	18	15

试验中用于点样的克隆,其 PCR 扩增纯化后要求产物浓度达到 500 ng/ $\mu$ L 以上,再进行点样。这是因为在点样过程中,PCR 产物保存在 384 孔板里,每个克隆至少需要 10  $\mu$ L 的体积量,点样仪才能操作,而实际上点样针取样的量非常小(pL 级),所以保证点样的浓度,才能保证芯片的质量。在点样前进行矩阵设计时,为了减少信号误差,每一个克隆在同一张基片不同位置进行一次重复,因为本试验的被点样本是来源于雌雄消减文库,消减文库一般通过 *Rsa* I 酶切,得到的 DNA 片段偏短(500 bp 左右),短片段和芯片片基的结合能力小,结合效率低,信号偏弱。信号偏弱可造成可重复性相应降低,所以必须加大重复力度。同样,为了数据的可靠有效性,试验还设计了雌雄虫探针的反标,主要是为了减少因 Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 两种荧光物质本身标记效率的差别而导致信号过弱的现象。另外,芯片扫描后,用相应软件对原始数据做均一化处理,降低了系统误差,从而使表达差异基因的筛选结果才更加可靠。

从编码的基因看,雄虫克隆多是编码主要精子蛋白(MSPs)、蛋白激酶、丙酮酸脱氢酶的基因;雌虫主要是编码免疫抑制卵巢信息蛋白、卵黄源蛋白以及超氧化歧化酶等基因。本研究发现有 106 个新杆属线虫 ESTs 序列与雄虫特异性基因存在同源性,

大部分 ESTs 的功能已基本明确,其中 MSPs 作为线虫特异性细胞骨架蛋白,占了整个精子细胞总蛋白的 10%~15%,通过解聚反应,在推动细胞向前运动方面起到重要作用<sup>[19]</sup>。在秀丽新杆线虫, MSPs 的编码基因大多数进行转录,每个基因能提供的 mRNA 占整个细胞 mRNA 的 1%~3%,但是猪蛔虫只有一个单一的基因可以转录。雌虫 ESTs 序列与秀丽新杆属线虫的同源性也存在很大相似性,其中以免疫抑制卵巢信息蛋白和卵黄源蛋白基因编码的蛋白居多。包括猪蛔虫在内的很多线虫 *vit* 基因与秀丽新杆线虫有很大相似性,试验也发现免疫抑制卵巢信息蛋白、超氧化歧化酶的比例也很高,这两种酶可能与雌虫超大的产卵率及其虫卵顽强的生命力相关。

本研究成功应用 cDNA 芯片技术筛选出猪蛔虫性别特异差异表达基因,其中 31 个很可能是新基因。差异表达基因的获得,为下一步采用 RNAi 技术研究性别相关基因的功能奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 汪明. 兽医寄生虫学[M]. 第3版. 北京:中国农业出版社,2003. 262~265.
- [2] 翁亚彪. 集约化猪场实用驱虫技术手册[M]. 广东:广东科技出版社,2003. 1~4.

- [3] 邹丰才,吴绍强,黄翠琴,等. 寄生线虫性别特异表达基因研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2005,23(4):246~249.
- [4] Nisbet A J, Gasser R B. Profiling of gender-specific gene expression for *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida) by microarray analysis of expressed sequence tag libraries constructed by suppressive-subtractive hybridization[J]. Int J Parasitol, 2004,34: 633~643.
- [5] Morimoto M, Zarlenga D, Beard H, et al. *Ascaris suum*: cDNA microarray analysis of 4th stage larvae (L4) during self-cure from the intestine [J]. Exp Parasitol, 2003,104(3-4):113~121.
- [6] Li B W, Rush A C, Tan J, et al. Quantitative analysis of gender-regulated transcripts in the filarial nematode *Brugia malayi* by real-time RT-PCR [J]. Mol Biochem Parasitol, 2004,137(2):329~337.
- [7] Boag P R, Newton S E, Gasser R B. Molecular aspects of sexual development and reproduction in nematodes and schistosomes[J]. Adv Parasitol, 2001,50: 153~198.
- [8] Michalski M L, Weil G J. Gender-specific gene expression in *Brugia malayi* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1999,104(2):247~257.
- [9] Southern E M, Maskos U. Support bound oligonucleotides[P]. International Patent Application: PCT 89/01114,1988.
- [10] Drmanac R, Labat I, Bruket I, et al. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method [J]. Genomics, 1989,4(2):114~128.
- [11] Schena M, Shalon D, Davis R W, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. Science, 1995, 270 (5 235):467~470.
- [12] 邹丰才,吴绍强,李明伟,等. 表达谱基因芯片技术及其在兽医学上的应用[J]. 中国人兽共患病杂志,2005,4: 346~349.
- [13] Xiang C C, Chen Y. cDNA microarray technology and its applications [J]. Biotechnol Adv, 2000,18(1):35~46.
- [14] Boothroyd J C, Blader I, Cleary M, et al. DNA microarrays in parasitology: strengths and limitations [J]. Trends Parasitol, 2003,19(10):470~476.
- [15] Venkatasubbarao S. Microarrays status and prospects [J]. Trends Biotechnol, 2004,22(12):630~637.
- [16] 吴绍强,邹丰才,翁亚彪,等. 利用抑制消减杂交技术筛选猪蛔虫性别差异表达基因[J]. 中国农业科学, 2005,38(5):1 040~1 045.
- [17] Yang G P, Ross D T, Kuang WW, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1999,27(6):1 517~1 523.
- [18] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992,257(5 072):967~971.
- [19] Klass M R, Kinsley S, Lopez L C. Isolation and characterization of sperm-specific gene family in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Mol Cell Biol, 1984,4 (3):529~537.