

# 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)丝氨酸蛋白酶 I-1 基因多态性\*

付瑞雪 周纳宇 刘金相 王旭波 贺艳 张全启 于海洋<sup>①</sup>

(中国海洋大学海洋生命学院 海洋生物遗传学与育种教育部重点实验室 青岛 266003)

**摘要** 采用重测序方法,利用牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)野生个体,扩增了牙鲆丝氨酸蛋白酶(Serine protease) I-1 基因的编码区(CDS)和 2605 bp 的启动子序列。在牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因(*PoSP I-1*)编码区中筛选出 9 个单核苷酸多态性位点(SNPs),同时在其启动子区筛选出 28 个 SNP 位点。对感染鳃弧菌的抗病牙鲆和易感牙鲆进行了部分 SNP 位点的分型,通过分析 CDS 中 SNP 位点的分布情况,发现 SNP365A/G 位点在抗病个体中的 AG 基因型的基因频率是 60%,高于易感个体的 40% ( $P=0.01$ )。qRT-PCR 结果显示,易感个体在细菌感染后,*PoSP I-1* 相对表达量相比对照组呈下降趋势。在抗病个体中,*PoSP I-1* 相对表达量相比对照组呈上升趋势,且高于易感个体。结果表明,丝氨酸蛋白酶基因在牙鲆抗鳃弧菌感染中发挥重要作用,该基因的 SNP365A/G 位点是与牙鲆鳃弧菌感染相关的候选位点,该位点可作为牙鲆抗鳃弧菌选择育种的潜在标记。

**关键词** 丝氨酸蛋白酶基因; 牙鲆; 鳃弧菌; 多态性

**中图分类号** S96 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)05-0055-08

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在人工养殖条件下,极易暴发各种疾病,特别是细菌性疾病(曲凌云等,2000;于大国等,1998),鳃弧菌病是其中一种危害性较大的细菌性疾病,病原菌鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)在沿岸海水和海洋动物体中广泛存在。近年来,利用生物自身的蛋白酶、抗菌肽等加强其先天性免疫能力被认为是行之有效且天然绿色的方法。

丝氨酸蛋白酶是一类以丝氨酸为活性中心的蛋白水解酶,在先天性免疫系统中起着至关重要的作用,它可以通过补体系统、酚氧化酶原激活系统及血淋巴凝结和抗菌肽合成等途径识别异物;可以将信号级联放大,引起特定的免疫反应,从而快速启动相应的免疫防御系统;可以定时、定量、局部的抵御病原体的感染(Budayova-Spano *et al.*, 2002)。

SNP (Single nucleotide polymorphism)即单核苷酸多态性,是生物体基因组中的单碱基突变,往往与

许多生物体机能的改变和疾病的发生有关,目前被广泛用于海洋生物的分子生物学研究中。Li 等(2013)研究了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)溶菌酶基因的多态性,发现 Lysozyme 的 4 个 SNP 位点与其对鳃弧菌病的抗病/易感具有相关性,并提出了 4 个与抗病关联的基因型和单倍型。Wang 等(2011)和 Wan 等(2013a、b)利用呼肠弧病毒感染草鱼,研究了免疫相关基因 LGP2、RIG-1 及 Mx2 中的 SNP 位点,这 3 个基因中均存在与抗呼肠弧病毒具有显著相关性的 SNP 位点基因型。

本研究利用重测序的方法,扩增了牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因的编码区序列(Coding sequence, CDS)及启动子序列,筛查了该基因 CDS 和启动子区的多态性位点,并对部分 SNP 位点在鳃弧菌感染的抗病个体和易感个体中进行了基因分型,以寻找与抗病相关性的多态性位点,为牙鲆抗病育种提供候选标记。

\* 国家自然科学基金青年科学基金(31101891)资助。付瑞雪, E-mail: furuixue926@163.com

① 通讯作者: 于海洋, 副教授, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn

收稿日期: 2015-03-09, 收修改稿日期: 2015-05-15

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验所用健康牙鲆混合家系取自山东省海阳黄海水产有限公司,平均体长为20 cm,注射鳃弧菌之前,在22℃的充气海水中暂养7 d。

鳃弧菌菌株(vib72)分离自挪威的Cod。鳃弧菌菌株由中国海洋大学海洋生命学院张晓华老师提供。

### 1.2 鳃弧菌注射

将鳃弧菌标准菌株进行活化、复壮和分离,接种在2216E固体培养基上,37℃培养24 h,用灭菌生理盐水震荡清洗,用平板涂布计数法测定菌液浓度,并配成 $10^9$  CFU/ml的菌悬液,用于腹腔注射。

注射鳃弧菌实验时,将90尾健康牙鲆平均分到3个1000 L的缸中,每缸30尾个体,两组为实验组,1组为对照组。实验组用于鳃弧菌的注射,每千克体重注射400  $\mu$ l鳃弧菌悬浮液( $10^9$  CFU/ml)。对照组注射生理盐水。所有的牙鲆在同等条件下饲养,前48 h,每4 h观察1次,48 h后,每2 h观察1次,记录死亡时间,立即取出死亡个体的肝、肾、脾、鳃免疫器官,放入液氮中冻存。若需长期保存,转入-80℃冰箱,用于RNA的提取。同时取出死亡个体的少量肌肉组织,在-80℃冰箱保存,用于DNA的提取。持续观察6 d,实验结束时,记录存活个体数量。实验结束后,用上述方法对存活个体进行取样。将早期死亡的牙鲆视为鳃弧菌易感个体,而在注菌实验中始终存活的个体为抗病个体。

### 1.3 基因组DNA的提取

基因组DNA的提取采用常规的酚-氯仿提取法(张全启等,2004)。取上述抗病和易感牙鲆个体的肌肉组织大约50 mg,放入1.5 ml离心管中,用手术剪将组织块尽量剪碎,加入550  $\mu$ l TNES裂解缓冲液和10  $\mu$ l蛋白酶K(20 mg/ml)。混匀后置于56℃水浴中直至肌肉组织消化完全。裂解物用等体积的饱和酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)和氯仿/异戊醇(24:1)各抽提两次,12000 r/min离心15 min。取上清液加入1/10体积的3 mol/L NaAc和700  $\mu$ l异丙醇,置于-20℃沉淀2-3 h。之后,4℃、12800 r/min离心20 min沉淀DNA。沉淀物用无水乙醇洗涤两次,室温自然干燥。待乙醇挥发完全后,用适量TE溶液溶解。-20℃保存备用。

### 1.4 总RNA的提取和cDNA第一条链的合成

牙鲆的肝脏、肾脏、脾脏和鳃的总RNA的提取按照Solarbio公司的TRIzol Reagent说明书进行。得

到的总RNA按照TaKaRa公司的Recombinant DNase I的说明书进行基因组DNA的去除和RNA的纯化。采用Nanophotometer Pearl和琼脂糖凝胶电泳检测纯化后RNA的浓度和完整性。按照TaKaRa公司的反转录酶M-MLV的使用说明进行cDNA第一条链合成,并将cDNA置于-80℃冰箱备用。

### 1.5 *PoSP I-1* CDS及启动子区域的克隆及测序

根据*PoSP I-1* CDS序列(GenBank accession No. AB191200.1),使用Primer Premier 5.0软件设计扩增*PoSP I-1*全长的引物(表1)。该基因的启动子序列利用cDNA序列Blast牙鲆基因组测序数据获得。用筛选出的5尾抗病个体和5尾易感个体的cDNA进行*PoSP I-1* CDS中SNP筛选及其启动子的扩增。PCR反应体系:10 $\times$ PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>) 2.5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ l, dNTP (2.5 mmol/L) 2  $\mu$ l, 正反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各0.5  $\mu$ l, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ l) 0.25  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 17.75  $\mu$ l。PCR反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 28个循环; 72℃延伸10 min。使用Vector NTI Advance 10.11 (Invitrogen)软件用于测序结果的序列比对、注释及SNP的查找。使用TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/tfsearch.html>)进行*PoSP I-1*上游调控区域转录因子结合位点的分析。根据NCBI已发布的*PoSP I-1*的cDNA序列,结合已经发表的其他动物丝氨酸蛋白酶的cDNA序列,用MEGA 5.0软件的邻位相连法构建系统进化树,Bootstrap值为1000。

### 1.6 重测序、SNP的分型及其数据分析

利用攻毒实验中所获得的易感个体和抗病个体的cDNA样品,进行该基因的重测序和SNP位点的分型。设计牙鲆*PoSP I-1*基因的重测序引物(CCXSPI-1Fw和CCXSPI-1Rv)(表1)。退火温度为60℃,PCR扩增体系及反应条件见1.5。查找测序结果*PoSP I-1*的SNP位点(突变的较小等位基因频率MAF<0.03视为测序错误)。抗病个体和易感个体的频率差异用卡方检验分析,数据的显著性通过SPSS软件进行检验。

### 1.7 *PoSP I-1*在牙鲆对照、抗病及易感个体的表达

使用实时定量PCR(qRT-PCR)来分析*PoSP I-1*在注射生理盐水的对照个体以及注射鳃弧菌后呈现的易感个体和抗病个体中的表达水平。从上述的对照、易感和抗病牙鲆中提取获得肝脏、肾脏、脾脏和鳃的cDNA样品。18S rRNA基因用于内参基因(Zhong *et al*, 2008),引物及退火温度见表1。目的基因的Ct值与内参基因18S的Ct值进行比较,qRT-PCR结果分析使用2<sup>-( $\Delta\Delta C_t$ )</sup>方法。

表 1 本研究所用到的引物  
Tab.1 Primers used in the study

引物名称 Primer name	产物长度 Product size (bp)	序列 Sequence(5'-3')	退火温度 Tm (°C)	用途 Usage
SPI-1Fw	717	TTCCTACTCATGCTGGTCTTTG	53	扩增 CDS 序列
SPI-1Rv		TTTAACACTCCAGTAATCCAGTCCC	56	扩增 CDS 序列
CCXSPI-1Fw	110	TGTCAGATCTATTCCCCATCC	60	重测序
CCXSPI-1Rv		ACTGTGAGGCAGCGACTCC	60	重测序
QDZSPI-1Fw	2690	TGGGCAGGAGAATACAAACAA	58	扩增启动子序列
QDZSPI-1Rv		CCAACAATACGAGAACCATCAG	57	扩增启动子序列
qSPI-1Fw	110	GTGCAGCTGATCTCTCTGAAA	60	qRT-PCR
qSPI-1Rv		TGAAGCGTGTGGGTAAGG	60	qRT-PCR
18SFw	100	GGTAACGGGGAATCAGGGT	60	qRT-PCR
18SRv		TGCCTTCCTTGGATGTGGT	60	qRT-PCR

## 2 结果

### 2.1 鳎弧菌感染牙鲆

在注射鳎弧菌 20 h 后, 实验组中开始出现死亡个体, 之后每 2 h 观察 1 次, 直至观察到第 6 天不再有死亡个体为止。对照组未发现牙鲆死亡。在实验组中, 共有 30 尾牙鲆死亡, 有 30 尾牙鲆始终存活。

### 2.2 *PoSP I-1* CDS 的扩增及 SNP 筛查

成功扩增 10 尾 *PoSP I-1* 的编码区(CDS)序列。

分析测序获得的 717 bp 的 *PoSP I-1* CDS, 共发现 9 个 SNP 位点, 相当于每 80 bp 有 1 个 SNP(图 1), 最小等位基因频率从 0.03 到 0.26。在这 9 个 SNP 中, 仅有 1 个位点是同义突变, 其余 8 个均为非同义突变(表 2)。非同义突变与同义突变的比例是 8, 表明 *PoSP I-1* 处于正向选择中。

通过构建进化树分析得知(图 2), 牙鲆中丝氨酸蛋白酶 I-1 基因首先与牙鲆的丝氨酸蛋白酶 2 聚为一支, 之后与其他鱼类, 如线鳢的丝氨酸蛋白酶 1 聚为一支, 同时丝氨酸蛋白酶 I-1 基因也和鱼类的其他丝氨酸

```

1      ATGCTGGTCTTTGTCTAAATGAAGCTGATGGTTCTCGTATTGTTGGCGGTAGAGATTCT
1      M L V F V L N E A D G S R I V G G R D S
61      G C C C C C A C T C A C G C C C T A C A T G C T T C G T G C A A G T C G G A G G T A G C C A T A A C T G T G G G
21      A P H S R P Y M A S L Q V G G S H N C G
121     G G A C T G G T G A A A G A A A A C T T G T C C T C A C T G C A G C A C A T T G T G C G A T A C C T G T G C C A
41      G A L V K E N F V L T A A H C A I P V P
181     T A C A C A G T T G T G C T C G G C G T T G A T T C C C T G T C A G G T A C G A G A C T A C A A A C A G G A A T T C
61      Y T V V L G V D S L S G T E T T K Q E F
241     A G A A C T G T C A G A T C T A T T C C C C A T C C C G A T T A T G A T C G A C A T T C A A A T G A T A T A C A T G C T C
81      R T V R S I P H P D Y D R H S N D I M L
301     C T G A A G C T C A A T G G C A G T G C A C A A C T G A C T G A A G C A G T G C A G C T G A T C T C T G A A A C C G
101     L K L N G S A Q L T E A V Q L I S L K A
361     A T C A G G G T G A G G A C A G G G A G T C G C T G C C T C A C A G T C G G C T G G G G G G C A T A G G G G A T A A C
121     I R V R T G S R C L T V G W G D I G D N
421     A A C A C C T T A C C C A A C A C G C T T C A G G A G T C A A C G T A A C C A C T G C C A C A G C G G A C A T G T
141     N T L P N T L Q E V N V T T L P Q R T C
481     C G C A G G A G A T G G G A T C A G T T C C C A T C A T A G A T C A A T G G T T G T G G T G T T G G G C C A G A
161     R R R W G S V P I T R S M V C G V G A R
541     A G G T T C A A G G C T T C T G C T C G G G G A T T C A G G T G G C C C T C T G G T G T G T A G T G A G C T G C A
181     R F Q G F C S G D S G G P L V C D G A A
601     G C A G G C G T T G T C T C T C T G G C A G G C G A T G C G G A G A C A A C A G G A C C C C T G A T G T C T A C
201     A G V V S F S G R R C G D N R T P D V Y
661     T C A A G T A T A C C T C C T C A G G G A C T G G A T T A C T G G A G T G T T A A C A G C A A A T A G
221     S S I S S F R D W I T G V L N S K *
    
```

图 1 *PoSP I-1* 的 CDS 及其氨基酸序列

Fig.1 CDS and the deduced amino acid sequence of *PoSP I-1*

起始密码子加粗表示, 终止密码子用\*表示。SNP 位点用框表示

The initiation codon is in bold and the termination codon is marked with \*. SNP sites are boxed

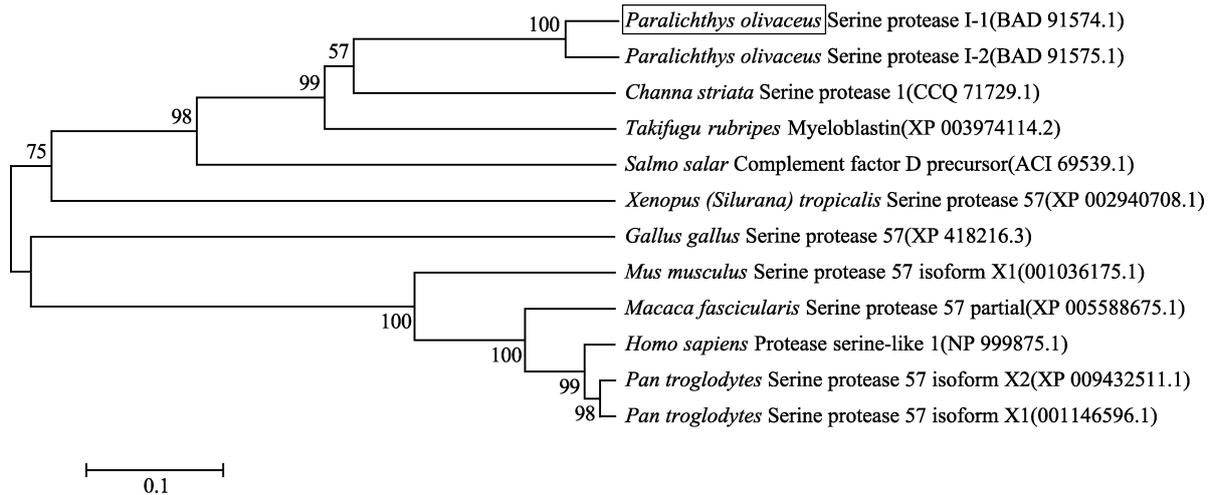


图 2 丝氨酸蛋白酶部分物种的系统进化树

Fig.2 The phylogenetic tree of serine proteases among some species

表 2 *PoSP I-1* CDS 中单核苷酸多态性位点(SNPs) (SNP 位置的命名从起始密码子开始)Tab.2 SNPs discovered in *PoSP I-1* (the position named from the start codon)

SNP	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	较小等位基因频率率 Minor allele frequency	S/NS
SPI-1SNP62	GAC/GCC	Asp/Ala	0.05	NS
SPI-1SNP86	TCT/GCT	Ser/Ala	0.05	NS
SPI-1SNP223	ACT/ACC	Thr	0.18	S
SPI-1SNP365	ACG/GCG	Thr/Ala	0.21	NS
SPI-1SNP415	GCC/GAC	Ala/Asp	0.03	NS
SPI-1SNP417	CTA/ATA	Leu/Ile	0.03	NS
SPI-1SNP456	GAC/GAA	Asp/Glu	0.03	NS
SPI-1SNP502	AGA/GGA	Arg/Gly	0.05	NS
SPI-1SNP518	CCT/ACT	Pro/Thr	0.26	NS

蛋白酶家族中的部分基因相似度较高, 如红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 的 Myeloblastin 及大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的补体因子 D 基因, 与其在系统进化中的地位相符。

### 2.3 *PoSP I-1* 启动子区域的多态性

选取 5 尾抗病个体和 5 尾易感个体, 成功扩增了 *PoSP I-1* 上游 2605 bp 的片段。对测序结果进行比对, 共查找出 28 个 SNP (图 3)。通过 TFSEARCH 预测转录因子结合位点, 分析 28 个 SNP 位点与预测的转录因子结合位点的关系 (图 4)。

在 *PoSP I-1* 启动子区域位点-13 上, 存在 T/C 的多态性变化, 预测对应的转录因子为 SRY; 在位点-423, 存在 T/A 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 同样地, 在-623 位点, 存在 C/A 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 在位点-748 上, 存在 G/C 的多态性变化, 预测结合的转录因子为 CdxA; 在位点-809、-811、-813 存在 C\_A\_C/T\_T\_A 的单核苷酸多态性变化, 预测结合的转录因子为 CDP CR; 在-1358 位点, 存在 A/G 单核苷酸多态性, 预

测结合的转录因子为 CdxA; 在-1583 位点, 存在 T/C 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 SRY; 在-1658 位点, 存在 T/G 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 CdxA; 在-1782 位点, 存在 T/G 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 C-Ets-; 在-2199 位点, 存在 A/C 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 GATA-2; 在-2388 位点, 存在 A/T 单核苷酸多态性, 预测结合的转录因子为 CdxA。

### 2.4 *PoSP I-1* 多态性位点-365A/G 与牙鲆抗病和易感的关系

通过重测序, 发现在 *PoSP I-1* 中有一个重要的多态性位点: SNP365A/G (起始密码子位置视为+1) (图 5)。SNP365 是从苏氨酸到丙氨酸的非同义突变。在该位点, AA 在易感组的频率是 36.7%, 但在抗病组的频率是 16.7%。并且, 在易感组 AG 的频率是 40%, 而在抗病组的频率是 60%。GG 在抗病和易感组的频率均为 23.3%。其中, 用卡方检验分析 SNP365A/G, 结果显示存在显著差异 ( $P=0.010$ )。

CAGAGAAGAGTCGAAAAGCTTAAATAAAAACTACTAATGCTGCTCCAGCTGCCTTCTACTTTCCAGTTTTGAACTTTCACTTTCTGGTTCTGTGTT  
 GCCAGTCTGTGCTTGACTGGGCAGGAGAATACAAACAATTCATCCTTAATAATGATAAATGACCTGAAGTGTGATCTGAAAATAATTTTTGGT  
 AACCTGTCATTCATGTCAAGCAGTCTAGCCACATTTTGGGTGTTTGGGATATTTTCAATTTGAGCTTTGTTTCGTCATCCAAATCATGAAGGAAT  
 T

TTAAATCATGCTTCTCCTCAAGCACAAACTTGAAACACAACACTGGCTACAAATAGGTATAGAAATGGTTTTAAAGCCCTAAATAAGCTTACTC  
 CTATACATGAGACACATTAGGCCTGTGTTTCAGGTGCTTTGGATATCCTTACTTGAGAACTTGAGTAGCAAGATCTTTAAAGGATGAAGTATCA  
 T

C

CATTTTGGCGGTCAAAGGTCAAAGGTCAAAGTCCAGGTGACCTCACAAAGCACTTTTTTTTTGCCTTGCGAAGGTGATTTCTCTGGAACAGACAAAG  
 GAATCCTTTTACATTTATGGTACAAACATTCACCTGGAGTCAAGTATTAACCTCATTGATTTTCAATAAAATGATGTCTTACATTTTTTAAAGGG  
 TTTTTTCTCAGGATGTTGAAGGGGGCAGCGCCAGCTCCCATACTAAAAATTTCCCTTTTTTTTTTCCACTCCTCACCTGAATTTCTTAGC  
 G

TTTGGTTATCTCCTATGAGAAAAGTGAACAAACTGCCAGCAACAAAACCTAATGCTGAACCTTTGGATCAGTTCAAAGACTTAGAAATTCAGTAAAA  
 G

ATGTGGCTAGCTTTGGTATTCAGCAAAGAATATGAAGAATCTTAAACAGAGTTGGTGTATTTGTACAGTGGCATCTCTCTGGTTTCAGGAGGCC  
 C

GGGGCTCATGGTAATATCCACTGTTTTCAGTTGTGTTTCAGTTTCAGTGGAGTGGCGTAAATGCAGCAATAGTCAACAGATTTTTTCTCTATATGATA  
 AAATTTACTCAGTGGACATGGATCCCAACAGATCATCATATGTGGAATGGAAAATCTGCCGATTCAGTATTGGAGAGATACATTTGCATTTCTC  
 T

AAATTTCTATAATGAGTCTTTAACTGAAAATTAATAAAGAAACATTTGTTAATGGTCTGTATGTATATAGCGATTTCTTAGTCTTGATGACCACT  
 G

CAAAGCGCTTCACTCTACAGTTATTTTCAAAAATGTGCTTTCCGGCTCCCAACAGAGTTCAGTTTCAGACTGTGGTATGTTGCATAACTCAAACC  
 G C

ACATTTCTTTCTCAGAACAGTCTTTAAACACAAGTATGTAACCTTGTGCGAAAAGAGGAAAGTATATAACTGTCATAACTTAAGCAATAACAAA  
 GGCCACATTTTTTCTGATAAAGACAACCTAAATCCCATGAAAAGAGTTTGACCTTCAATTCATCACTGTGCGAAATTCGCGTAGTTTCAAACCTTA  
 T G

AAGATTTACAATAACATATTGTTTGTACATGTAACCGTATTTGTATTGTATTATATTTATATTTTGTCCCACTGTAGCATATTGTAGCAAATATG  
 G

GTTATTACTGTACTGTGATAGCTAAATTTGTGTTGCACAAGATAGTTTGAACGAGCAGCTTGACATGATTAGATGGCGGATGCGGAGGAGCAACA  
 GTGGCGTCCATCCACTCCACACTAATATGCAAGTTCAACTTAAATGACCTAAAATGGCTTTGAGGTACAATCAATGTTGATGAATTTGGCTCAAC  
 T T T T A

TGCTAATGAAATGAATAAAAACATAAAGTCTGGTATCAATTATAACACTAATTTTCAAAGTTGCTAAACCACTCAACCGATTTTATAGAGGTGGGG  
 C

CATAACCAAGAAAGAGCCCATTTGTAATTTGGTGCATATCAGAGGGTGACACCAGCAATTTCTTTTCAAAGTATGTACTAATCCTGATCATGATAA  
 A

AGACATTCAGACCAGACTGTTGGAGTCTGTGCAATTTGGTGCAGATCCAAATCCAAATCTGGATCAAGTGCTTTTAAATTAGGTTTTATAGGGGTG  
 G C

TAGGCTTTTTTCAAACACAAGTAACAAGCAGAGGAAACCAGTAACCTGACACTAATGTGTAGCTGAGAAACAATAATGTTGGCCAGTACCTGTTTCAA  
 A A T

AGGAACGTGTTGGGCTTTGGAGGATTCTACTGAGTGCAACCTAGTTTCTATTTTATTAGCAACGGTTTTGACACATATTTACTTAATAATAATTCT  
 C T

ACAGACAATTTCTAAAAGTGTAGACATGATTTCTGGGGACACATAACAATAAACATGAATGAGAACTTTGAGCCACTAAAGCTGTTGATGCATTAAC  
 CACAACGTCCGGTTCATCAATTATGAAACCTGTTTTGAAAATAAACCCACGTCTTTTGTAAACAGCTTCAAAAATAGCATGTTAGCACATTCCT  
 GAAGCAATAAAGACCACAAAATAAGCAAGATGTTTTCTTCCAAATATTTATAAGACCAAGAGTGAAGGTAGATCAGAGCAGCGACCATGGCGG  
 A

TTGGTTTCTACTCATGCTGGTC  
 C

图 3 *PoSP* I-1 启动子序列的单核苷酸多态性  
 Fig.3 SNPs of serine protease I-1 promoter region in *P. olivaceus*  
 多态性位点用下划线表示, 多态性位点变化在下方表示  
 The polymorphism sites are underlined, and their variants are indicated

-2424	ATTTGAGCTT TGTTCGTCA TCCAAATCAT GAAGGA <u>ATT</u> T AAATCATGCT	score
	----->	CdxA
-2226	TTAGGC <u>C</u> TGT GTTCAGGTGC TTTGGATA <u>T</u> TC CTTACTTGAG AAACCTGAGT	score
	----->	GATA-2
-1808	GCGCCCAGCT CCCCATACTA AAAAAT <u>T</u> TCC TCTTTTTTTT TCCCACTCCT	score
	----->	c-Ets-
-1662	AGAA <u>T</u> TCAGT AAAAATGTGG CTAGCTTTGG TATTCAGCAA AGAATATGAA	score
	----->	CdxA
-1612	GAATTCCTAA CAGAGTTTGG TGTATTTGT <u>T</u> ACAGTGGCAT CTCTTCTGGT	score
	----->	SRY
-1366	CAAATTC <u>T</u> AT AATGAGTCTT TAACTGAAAA TTAAAAATAA AGAAACATTG	score
	----->	CdxA
-853	AATATGCAAG TTCAACTTTA AT <u>G</u> ACCTAAA ATGGCTTTGA GGTA <u>CAAT</u> CA	score
	----->	CDP CR
-753	GTCTG <u>G</u> TATC AATTATAACA CTAATTTTCA AAGTTGCTAA ACCACTCAAC	score
	----->	Cdx
-653	GTGCATATCA GAGGGTGACA CCAGCAATTT <u>C</u> TTTTCAAAG TATGTACTAA	score
	----->	SRY
-455	AGTAACTGAC ACTAATGTGT AGCTGAGAAA CATAATGTGG CCAGTGAC <u>C</u> T	score
	----->	SRY
-55	GACCAAGA <u>G</u> T GGAAGGTAGA TCAGAGCAGC GACCATGGCG GT <u>T</u> GGTTTCC	score
	----->	SRY

图 4 *PoSP I-1* 启动子区域预测的转录因子结合位点  
Fig.4 Diverse of putative binding sites for transcription factors of *PoSP I-1*

TFSEARCH 数值在右侧表示，预测转录因子的结合位点的位置和方向用箭头表示，SNPs 用下划线表示  
The TFSEARCH scores are presented on the right. The location and the orientation of putative binding sites for transcription factors are marked with arrowhead. SNPs are underlined

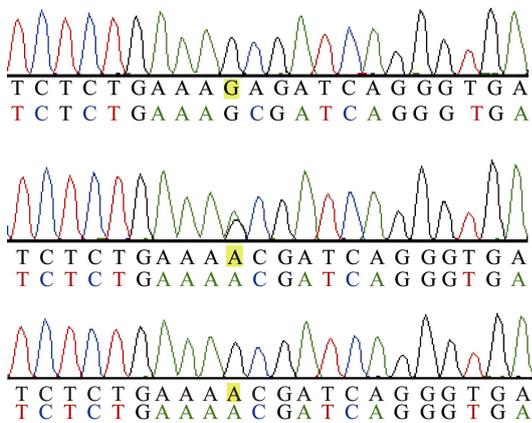


图 5 *PoSP I-1* CDS 中 SNP365A/G 位点的色谱  
Fig.5 Sequence analysis of serine protease I-1 gene in CDS with chromatograms showing SNP365A/G in *P. olivaceus*

表 3 *PoSP I-1* SNP365 位点与牙鲆鳃弧菌抗病相关性的分析  
Tab.3 Correlation analysis of SNP365 of *PoSP I-1* with disease-resistance in *P. olivaceus*

个体 Individuals	样品数 Number	基因型 Genotype(%)			P
		AA	AG	GG	
易感个体 Susceptible	30	11(36.7)	12(40)	7(23.3)	
抗病个体 Resistant	30	5(16.7)	18(60)	7(23.3)	0.010

### 2.5 *PoSP I-1* 在牙鲆对照、抗病和易感个体的表达水平

使用鳃弧菌感染牙鲆后，*SP I-1* 基因在易感组牙鲆的肾脏中的相对表达量最高，其次是脾脏、鳃和肝脏。抗病组牙鲆，*PoSP I-1* 在所研究的免疫组织中均有表达，在肾脏中的相对表达量最高，其次是鳃、脾

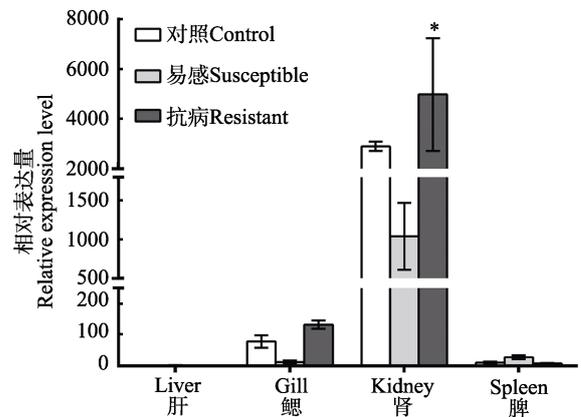


图 6 注射鳃弧菌后 *PoSP I-1* 在牙鲆对照个体、抗病个体和易感个体的肝、鳃、肾和脾组织的表达水平

Fig.6 The expression of serine protease I-1 mRNA in liver, gill, kidney and spleen in control, resistant and susceptible individuals of *P. olivaceus* after *V. anguillarum* injection

脏和肝脏。在易感组中, *PoSP* I-1 的相对表达量比对照组显著降低。抗病个体中的相对表达量显著高于易感个体和对照组个体。

### 3 讨论

近年来, 病害的频繁暴发给中国的牙鲆养殖业造成严重的经济损失, 牙鲆病害的防治方法亟需解决。牙鲆作为一种硬骨鱼类, 有一定的获得性免疫力, 国内已有抗病疫苗问世, 如抗淋巴囊肿病疫苗(郑风荣, 2006)<sup>1)</sup>, 但对于牙鲆的主要细菌性病害如鳃弧菌病, 目前还没有行之有效的疫苗。目前, 分子标记技术已被广泛应用于水产生物的选择育种。多个与免疫相关的基因, 如主要组织相容性复合体(MHC)、甘露糖结合凝集素(MBL)等的多态性与动物个体对特定疾病的易感性/抗性相关。在鱼类中免疫相关基因的多态性位点与细菌、病毒感染的重要关系, 提示可以开发抗病候选基因的 SNP 位点作为抗病的潜在分子标记。但是, 目前对牙鲆病害抵抗的分子机制了解较少, 仅有关于 MHC 基因的多态性与牙鲆对鳃弧菌抗性的相关研究(Xu *et al.*, 2008)。因此, 辨别与病害抵抗相关的免疫基因可以为牙鲆的选择育种提供有力帮助。

丝氨酸蛋白酶相关基因编码区的突变, 特别是非同义的突变, 由于可以引起蛋白质结构或功能的变化, 可以作为疾病相关多态性标记的研究重点。本研究利用重测序的方法, 发现 *PoSP* I-1 CDS 有高多态性, 其 CDS 包含 9 个多态性位点, 相当于每 80 bp 有 1 个 SNP。同时发现了启动子区的 28 个 SNP 位点, 研究其转录因子结合位点发现, 部分 SNP 位点是转录因子 CdxA、CDP CR 等的结合位点, 而这些转录因子调控的基因往往与免疫有关: 如转录因子 CdxA 基因是免疫相关 SP-A 基因的调控因子。因此, 研究这些启动子区多态性与基因表达调控的关系, 将同样是下一步研究免疫候选基因的重要组成部分。本研究中, 牙鲆丝氨酸蛋白酶 I-1 基因 365A/G 颠换与牙鲆对鳃弧菌抗性的相关性分析显示, 该 SNP 位点基因型在易感个体中的频率与抗病个体有显著差异( $P < 0.05$ ), 其差异主要是因为 AG 基因型在抗病个体中的频率显著高于易感个体, 表明 365A/G 基因型与牙鲆对鳃弧菌的抗性有关。SNP365 是非同义突变, 会引起从苏氨酸到丙氨酸的氨基酸序列的变化, 由于该变化是从疏水性氨基酸到亲水性氨基酸的变化, 这可能会引起蛋白质活性的改变, 如果该位点是关键的结构域, 则

这种改变会对蛋白的活性产生影响, 从而影响 *PoSP* I-1 的功能以及宿主抵抗病害能力。

qRT-PCR 结果显示, *PoSP* I-1 在免疫组织中广泛表达, 在肾组织中表达量最高, 其次是鳃、脾脏和肝脏。在易感个体中, *PoSP* I-1 相对表达量比对照个体显著降低, 提示易感个体 *PoSP* I-1 在受到细菌感染后处于下调状态, 这可能与易感个体感染细菌后迅速死亡的原因有关。而在抗病个体中, 相对表达量要显著高于易感个体和对照组个体, 尤其在抗病个体中, 肾的相对表达量是非常高的, 这一结果说明抗病个体的 *PoSP* I-1 在细菌感染后下调受到了抑制, 而且表达量有显著上升, 可能与其补体系统免疫能力有关。补体系统具有天然的免疫功能, 但其必须先通过丝氨酸蛋白酶的酶促级联反应激活后才能发生生物学效应。补体系统在哺乳动物的研究与肾脏疾病和炎症发病有着重要的关系, 在抗病个体的肾组织中的相对表达量大大升高可能与丝氨酸蛋白酶在补体系统中的作用有关, 但是仍然需要在牙鲆群体中进行基因分型的验证实验, 从而进一步揭示该基因相对表达量的变化与 SNP365A/G 基因型的关系。

综上所述, 本研究通过重测序的方法, 在 *PoSP* I-1 CDS 中发现 9 个 SNP 位点, 其中, 8 个位点为非同义突变, 揭示该基因可能存在正向选择。通过研究 365A/G 位点, 发现其 365 位点基因型频率在易感个体和抗病个体中具有显著差异, 其差异源于 AG 基因型在抗病个体中的频率显著高于在易感群体中的频率( $P < 0.05$ ), 表明 365A/G 基因型与牙鲆对鳃弧菌的抗性显著相关, 提示此基因型可作为抗病相关的候选分子标记应用于牙鲆抗病育种。qRT-PCR 的结果进一步显示, 在注射鳃弧菌的牙鲆中, 在易感个体中该基因表达量下调, 而在抗病个体的主要免疫组织中 *PoSP* I-1 表达量上调, 且其相对表达量显著高于在易感个体中的相对表达量。以上结果揭示, *PoSP* I-1 是牙鲆抗鳃弧菌感染的重要候选基因, 其 CDS 中的 SNP365A/G 是一个重要的多态性位点, 有望成为牙鲆抗鳃弧菌病选择育种的候选标记。

### 参 考 文 献

- 于大国, 张宗伟, 孙永昌. 牙鲆仔鱼肠道白浊病及防治. 中国水产, 1998, 41(1): 41-42  
 曲凌云, 孙修勤, 张进兴. 养殖牙鲆淋巴囊肿病毒的电镜观察. 青岛海洋大学学报, 2000, 30(2): 105-110  
 张全启, 徐晓斐, 齐洁. 牙鲆野生群体与养殖群体的遗传多

1) 郑风荣. 淋巴囊肿病毒(Lymphovystis disease virus)核酸疫苗的免疫效果评价及安全性研究. 中国海洋大学博士研究生学位论文, 2006, 68-78

- 样性分析. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2004, 34(5): 816–820
- Budayova-Spano M, Lacroix M, Thielens NM, *et al.* The crystal structure of the zymogen catalytic domain of complement protease C1r reveals that a disruptive mechanical stress is required to trigger activation of the C1 complex. *EMBO J*, 2002, 21(3): 231–239
- Li L, Zhao JM, Wang LL, *et al.* Genomic organization, polymorphisms and molecular evolution of the goose-type lysozyme gene from Zhikong scallop *Chlamys farreri*. *Gene*, 2013, 513(1): 40–52
- Wan QY, Su JG, Chen XH, *et al.* Genomic sequence comparison, promoter activity, SNP detection of RIG-I gene and association with resistance/susceptibility to grass carp reovirus in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Dev Comp Immunol*, 2013a, 39(4): 333–342
- Wan QY, Wang L, Su JG, *et al.* Genetic structure, polymorphism identification of LGP2 gene and their relationship with the resistance/susceptibility to GCRV in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Gene*, 2013b, 521(1): 166–175
- Wang L, Su JG, Peng LM, *et al.* Genomic structure of grass carp Mx2 and the association of its polymorphisms with susceptibility/resistance to grass carp reovirus. *Mol Immunol*, 2011, 49(1–2): 359–366
- Xu TJ, Chen SL, Ji XS, *et al.* MHC polymorphism and disease resistance to *Vibrio anguillarum* in 12 selective Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) families. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(3): 213–221
- Zhong QW, Zhang QQ, Wang ZG, *et al.* Expression profiling and validation of potential reference genes during *paralichthys-olivaceus* embryogenesis. *Mar Biotechnol*, 2008, 10(3): 310–318

(编辑 冯小花)

## The Polymorphism of Serine Protease I-1 in Japanese Flounder (*Paralichthys olivaceus*)

FU Ruixue, ZHOU Nayu, LIU Jinxiang, WANG Xubo, HE Yan, ZHANG Quanqi, YU Haiyang<sup>①</sup>

(Key Laboratory of Marine Genetics and Breeding, Ministry of Education, Ocean University of China  
College of Marine Life Sciences, Qingdao 266003)

**Abstract** Serine proteases are enzymes that have serine, histidine and aspartic acid in their active domain and same catalytic mechanisms, which play important roles in many diseases and intracellular signal transduction. In this study, we amplified the coding sequence and promoter sequence (2605 bp) of serine protease I-1 from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (*PoSP* I-1). We identified 9 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 28 SNPs in the coding sequence and promoter sequence of *PoSP* I-1, respectively. The analysis of all SNPs indicated that the frequency of SNP365A/G in the coding sequence of *PoSP* I-1 is significantly different between the resistant group (60%) and the susceptible group (40%) ( $P=0.01$ ). *Vibrio anguillarum* injection reduced the expression of *PoSP* I-1 in the susceptible individuals but induced its expression in the resistant individuals. Moreover, *PoSP* I-1 in the resistant individuals is higher than that in the susceptible individuals. These results implied that *PoSP* I-1 is involved in the resistance of Japanese flounder to *V. anguillarum*. 365A/G of *PoSP* I-1 is a potential marker associated with the resistant Japanese flounders. In conclusion, *PoSP* I-1 365A/G is a candidate marker that could apply to disease resistant selective-breeding of Japanese flounder in the future.

**Key words** Serine protease; Japanese flounder; *Vibrio anguillarum*; Polymorphism

① Corresponding author: YU Haiyang, E-mail: yuhaiyang@ouc.edu.cn