

泥蚶(*Tegillarca granosa*) cDNA 文库的构建 及铁结合蛋白基因(Ferritin)序列分析*

贺静静¹ 李 晔¹ 李太武¹ 苏秀榕¹ 王孟前¹
李松伟¹ 周 军¹ 马 斌¹ 李强芳²

(1. “应用海洋生物技术”教育部重点实验室(宁波大学) 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211;
2. 广东省阳江市海洋与渔业局 阳江 529500)

提要 取正常泥蚶肌肉组织获得总 RNA, 纯化 mRNA 后, 利用含 Sfi 酶切位点的 CDS 引物逆转录合成 cDNA 第一链, 通过 LD-PCR 合成 cDNA 双链, 经胶回收除去短片段, 与 pDNR-LIB 载体进行连接, 电转化到大肠杆菌 DH10B 中, 构建形成原始文库, 进行滴度测试和重组率鉴定。结果表明原始文库的滴度为 3.17×10^5 cfu/ml, 重组率为 86.3%, 插入片段多在 500—2500bp 间。随机挑选 458 个克隆测序, 经分析获得 94 种已知基因及 87 种未知基因。其中包括铁结合蛋白(Ferritin)的全长 cDNA 序列。该基因序列全长 895bp, 5'-端非编码区为 163bp, 3'-非编码区为 213bp, 开放阅读框为 519bp, 编码 172 个氨基酸。推测其蛋白分子量和等电点分别为 20kDa 和 4.89。氨基酸序列与皱纹盘鲍、太平洋牡蛎、血红扇头蜆、文昌鱼、中华蟾蜍、非洲爪蟾、小家鼠以及人等的同源性有 62%—82%。比对结果表明, 铁结合蛋白基因在动物进化中高度保守。

关键词 cDNA 文库, 序列分析, 泥蚶, 铁结合蛋白基因

中图分类号 Q75

泥蚶(*Tegillarca granosa*), 俗称花蚶、血蚶、银蚶、蚶子等, 隶属于软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、列齿目(Taxodonta)、蚶科(Arcidae)、泥蚶属(*Tegillarca*), 是一种栖息于沿海滩涂的广温性双壳贝类, 主要分布于西太平洋、印度洋和大西洋海域的中国、韩国、泰国、菲律宾以及马来西亚等国家, 在我国分布于山东半岛以南沿海, 是山东、浙江、福建和广东等省重要的养殖经济贝类(王日昕等, 2005)。泥蚶肉味鲜美, 营养价值高, 含特有的血红蛋白和维生素 B₁₂, 有补血、温中、健胃的功效, 还具有一定的药用价值。蚶壳可做药, 有消血块、化痰之功效; 根据《本草经疏》记载: 蚶味甘, 性温, 无毒; 有补血、健胃功效; 主治血虚痿痹, 胃痛, 消化不良, 下痢脓

血等, 亦用于滋补强壮, 病后体虚(贾玉海, 1996)。另外, 泥蚶还含有多种无机元素。

目前对泥蚶的研究已有许多报道(董美强, 2000; 王万东, 2008; 竺俊全等, 2002; 李太武等, 2003; 苏秀榕等, 2005, 而对其基因方面研究较少, 在 GenBank 中公布的关于泥蚶的基因只有 102 条, 且多数是微卫星序列和核糖体 RNA 序列。已发布的重要功能基因有细胞色素 c 氧化酶 I 亚基的部分核心序列; 金属硫蛋白 mRNA 全序列; ITS、28S 核糖体 RNA 的部分核心序列; 类金属硫蛋白 mRNA 部分核心序列等。通过构建 cDNA 文库、测序, 进而克隆功能基因, 对开发利用泥蚶的基因资源具有重要意义。

铁结合蛋白(ferritin)是一类广泛存在于动物、植

* 国家自然科学基金资助项目, 30771665 号; 长江学者和创新团队发展计划资助项目, 2007—2009; 浙江省科技厅重点科研社会发展项目, 2005C23083 号。贺静静, 硕士研究生, E-mail: hjing85@163.com

通讯作者: 李太武, 教授, 博导, E-mail: litaiwu@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-03-27, 收修改稿日期: 2008-05-19

物和微生物中,由24个亚基组成的450kD巨大复合物(杜莉利等,2008)。它有很强的与铁离子的亲和力以及存储铁离子的能力,与转铁蛋白协同,在体内不仅起着结合铁的功能,在铁代谢中同样发挥着极为重要的作用(Wang *et al.*, 2009)。铁结合蛋白在体内免疫中也起着一定的作用,可以富集金属离子,使机体免受侵害。Levy等(2004)用细菌感染和脂多糖注射试验来研究果蝇体内铁结合蛋白的表达情况,发现表达上调。也有学者(Dunkov *et al.*, 1999)用氧化剂胁迫黄猩猩果蝇(*Drosophila melanogaster*),发现铁结合蛋白表达上调,表明铁结合蛋白还有抗氧化作用。对泥蚶铁结合蛋白基因序列的分析可为以后进一步研究该基因在提高泥蚶抗性的作用方面提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 泥蚶 本研究中所用的泥蚶(*Tegillarca granosa*)采自温州乐清。

1.1.2 试剂 总RNA提取采用Invitrogen公司生产的TRIzol试剂; mRNA纯化使用Promega公司的mRNA isolation system IV试剂盒; cDNA文库构建采用Clontech公司的Creator SMART cDNA Library Construction Kit试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取及纯化 取泥蚶肌肉组织,加入TRIzol,按TRIzol说明书提取总RNA。纯化mRNA,测浓度。

1.2.2 cDNA的合成

(1) 第一链cDNA的合成

在1个0.5ml微量管中依次加入3 μ l总RNA,1 μ l SMART寡聚核苷酸,1 μ l CDS III/3' PCR引物,吹吸混匀,72 $^{\circ}$ C 孵育2min,冰浴2min,轻旋微量管,再依次加入下列试剂:2 μ l 5 \times 第一链缓冲液、1 μ l DTT(20mmol/L)、1 μ l dNTP混合物(10 mmol/L)、1 μ l 反转录酶,混合好后置于42 $^{\circ}$ C 孵育1h,冰上终止第一链合成。

(2) 第二链cDNA的合成

在PCR管中依次加入下列物质并混合好:2 μ l 第一链cDNA、80 μ l PCR等级水、10 μ l 10 \times PCR Buffer、2 μ l 50 \times dNTP混合物、2 μ l 5' PCR引物、2 μ l CDS III/3' PCR引物、2 μ l 50 \times 多聚酶混合物,总体积为100 μ l。PCR循环参数:95 $^{\circ}$ C,1min; 27个循环:95 $^{\circ}$ C,20s; 68 $^{\circ}$ C,6min。循环结束后,取5 μ l PCR产物

电泳检测。

(3) 双链cDNA的纯化与回收

取LD-PCR产物进行纯化。将双链cDNA用切胶回收的方式除去短片段,用胶回收试剂盒进行胶回收。

(4) cDNA与载体的连接与转化

在10 μ l体系中,将cDNA定向连到pDNR-LIB(克隆位点:基因5'端为Sfi IA;基因3'端为Sfi IB载体中。体系为:取1.0 μ l cDNA、1.0 μ l 500ng/ml的pDNR-LIB、1.0 μ l 10 \times 连接缓冲液、1.0 μ l T₄ DNA连接酶、5.0 μ l 去离子水,16 $^{\circ}$ C连接过夜。将连接产物与大肠杆菌DH10B在1.5kV、200 μ s、25 μ F条件下进行转化。

(5) cDNA文库的质量鉴定

取1 μ l上述原始文库,用LB培养基进行10⁻³—10⁻⁶稀释后,涂布于含30 μ g/ml氯霉素的LB平板上,进行文库滴度测定。随机挑选菌落,采用M13通用测序引物,通过菌落PCR方法,估测文库的重组率,并通过电泳分析cDNA插入片段的分布范围,鉴定文库插入片段长度。

(6) 序列测定与分析

将原始文库进行用LB培养基进行10⁻³—10⁻⁶稀释后,涂布于含30 μ g/ml氯霉素的LB平板上,随机挑选458个菌落进行测序,测序结果与GenBank数据库中公布的已知基因进行序列同源性比较。

2 结果分析

2.1 总RNA的提取

提取的总RNA用紫外分光光度计进行检测,发现OD₂₆₀/OD₂₈₀和OD₂₆₀/OD₂₃₀的比值均>1.9,表明蛋白和DNA的污染少,RNA质量较好。用1%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA是否有降解,结果显示(图1)28S、18S和5.8S三条条带均有出现,且各条带特异性较好,条带间没有拖带,表明RNA没有降解。从上述结果中说明提取的总RNA质量良好,可用于cDNA文库的构建。

2.2 双链cDNA的检测及短片段的去除

取2 μ l双链cDNA进行琼脂糖凝胶电泳,从图2中可以看出cDNA条带较亮,主要集中在0.5—5kb。用胶回收方式除去短片段后,再进行琼脂糖凝胶电泳检测,从图3中可看出片段都在0.5kb以上。

2.3 文库库容与重组率测定

按[文库滴度(cfu/ml)=菌落数 \times 稀释倍数 \times 10³/

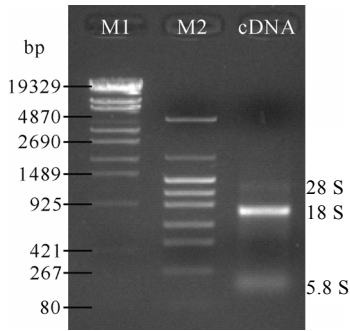


图 1 泥蚶总 RNA 电泳图

Fig.1 The pattern of total RNA of blood from *T. granosa*

M1: -EcoT14 I; M2: pHY

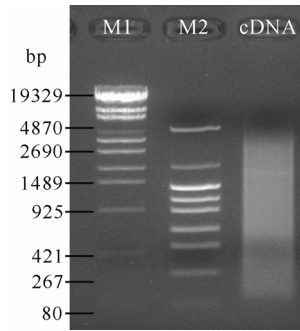


图 2 泥蚶双链 cDNA 电泳图

Fig.2 The double strain cDNA synthesis from mRNA of *T. granosa*

M1: -EcoT14 I; M2: pHY

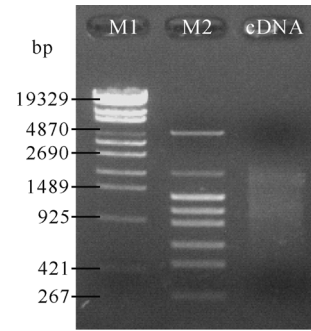


图 3 短片段除去后的双链 cDNA 电泳图

Fig.3 The pattern of dscDNA (short-fragment removed) from *T. granosa*

M1: -EcoT14 I; M2: pHY

菌液铺板体积]公式计算文库滴度,结果显示原始文库的滴度约为 3.17×10^5 cfu/ml。用菌落 PCR 方式鉴定文库重组率为 86.3%,且插入片段的长度都在 0.3kb 以上,1kb 以上的也占了 50%(图 4)。表明所插入的片段长度较好,文库质量良好。

2.4 序列测定及生物信息学分析

对 458 个克隆子进行了测序,其中 63 个空载,87 个无法确定基因类型,已知的 308 个基因共有 96 种,主要包括免疫相关基因:热休克蛋白(heat shock protein, HSP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、钙依赖蛋白激酶(calcium-dependent protein kinase)、铁结合蛋白(ferritin)、肿瘤抑制基因(prohibitin)等;结构相关基因:肌动蛋白(actin)、副肌浆球蛋白(paramyosin)、微管蛋白(tubulin)、核糖蛋白 G(nuclear ribonucleoprotein G)等;基因转录或蛋白表达相关基因:凋亡蛋白抑制剂(IAP)、调节蛋白(regulatory protein)、RNA 解螺旋酶(RNA-dependent helicase)等;细胞分裂相关基因:驱动蛋白(kinesin)等;代谢相关基因:还原型辅酶 I(NADH dehydrogenase)、氨基酸 N-乙酰化转移酶(amino-acid N-acetyl-

transferase)、糖基转移酶(Glycosyl transferase family protein)等;另有一些序列由于和染色体阳性克隆和 cDNA 克隆高度同源,因此其是否代表真正基因有待进一步证实。

2.5 铁结合蛋白基因(ferritin)的获得与序列分析

铁结合蛋白基因(ferritin)全长序列(895bp)包括 163bp 5'非编码区(5'-UTR)、519bp 开放阅读框(ORF)、编码 172 个氨基酸和 213bp 3'非编码区(3'-UTR)。3'-UTR 包括含 25bp 腺苷酸的 Poly(A)尾部及一个多聚腺苷酸化信号 AATAAA。在 ExPASy Proteomics tools 软件上对泥蚶 ferritin 的分子量和等电点进行估算,分别为 20kDa 和 4.89。Ferritin 上有 4 个铁结合位点:Glu-60、His-63、Glu-105、Gln-139(Kim *et al*, 2002)(图 5)。根据人类的铁结合蛋白重连的结构对泥蚶 ferritin 进行分析,其二级结构有五个螺旋结构和一个长环,这五个螺旋结构分别命名为 A、B、C、D 和 E,其氨基酸残基分别位于 11—38、41—71、94—120、121—157 和 158—169 处(Paul D *et al*, 1997)(图 6)。Ferritin 有三个公认的结构域,通过 NCBI BLAST 可找到这三个结构域,包括:亚铁氧化酶活性中心,

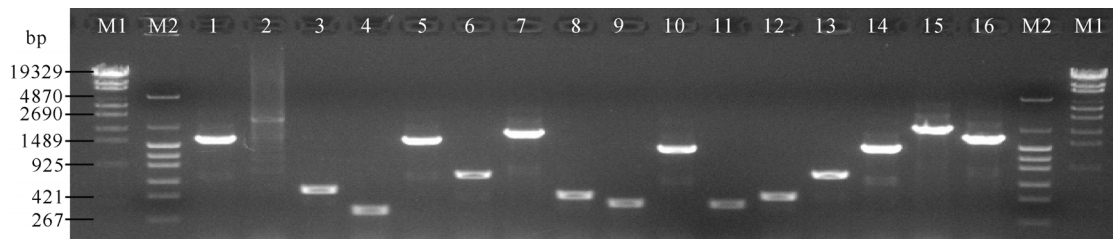


图 4 阳性克隆 PCR 检测电泳图

Fig.4 Plasmid of positive clones and the identification result by PCR analysis

M1: -EcoT14 I; M2: pHY; Line 1—16: PCR products of random clones

由 7 个氨基酸残基组成(Glu-25、Tyr-32、Glu-59、Glu-60、His-63、Glu-105 和 Gln-139); 亲水基团中心, 由 4 个氨基酸残基组成(His-55、Glu-57、Glu-58 和 Glu-61); 铁离子通道, 由 3 个氨基酸残基组成(His-116、Tyr-129 和 Glu-131)(图 5)。

将获得的泥蚶 ferritin 的氨基酸序列在 NCBI 上进行同源性分析, 发现其同源性与其它物种的比较都在 60%以上。其中与杂色鲍 *Haliotis diversicolor* (ABY87353)、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* (ABH10672)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (AAP83794)、文蛤 *Meretrix meretrix* (AAZ20754)、静水椎实螺 *Lymnaea stagnalis* (AAB24081)、血红扇头蜆 *Rhipicephalus sanguineus* (AAQ54715)、文昌鱼 *Branchiostoma belcheri* (AAN77903)、中华蟾蜍 *Bufo gargarizans* (ABD75379)、非洲爪蟾 *Xenopus laevis* (NM_001090588.1)、小家鼠 *Mus Musculus* (NM_026286.2)、人 *Homo sapiens* (NP_002023.1)的同源性分别为: 82%、80%、77%、78%、76%、74%、67%、67%、64%、62%、62%。

```

1  TATTTTCAACTCCGCAATTCCGCCATATTTTCACAAATGTTTAGCTGCGTCAGTGAACGTACGGACAAC
71  TTGTGAATCCAAATACTATTTTAAACATCTTTAAACAAACAGTTCAGTACATTGTCTGAAACAGCTT
141  GTTAAACAACCTGGTGTAAAAAATGCTCAAAACACAACCAAGACAAAACCTCCATGTAGAAAGTGAGGC
      M A Q T Q P R Q N F H V E S E A
211  CGGAATCAACAACAGATTAACATGGAGTGTATGCCAGCTATGTCTACCAGTCCATGTATATGTACTTT
      G I N K Q I N M E L Y A S Y V Y Q S M Y M Y F
281  GACAGAGATGATGGCTCTGCCTAGTTTGGCAAAGTACTTCAAACATACTGAAGAAGAACGTGAAC
      D R D D V A L P S F A K Y F K H N S E E R E
351  ATGCAGAGAACTTATGAAATACAAAACAAGAGAGGTGGCAGAATCGTCTTCAAGATATTCAGAAACC
      H A E K L M K Y Q N K R G G R I V L Q D I Q K P
421  TGACCTTGATGAATGGGGTCTCCACTGGAAGCCATGCAGACTACCTTAGCTCTGGAGAAAAGTGTC AAC
      D L D E W G S P L E A M Q T T L A L E K S V N
491  CAGGCCTTCTGGACCTGCATAAAATGCGAGATAAACATGGTGATGCTCAGATGATGATTTCTTGAAG
      Q A L L D L H K I A D K H G D A Q M M D F L E
561  GGAATACCTGAAAGAGCAGGTAGATGCTATTGAGGAGATATCAGATCACATCACCAATCTGAAACGTGT
      G E Y L K E Q V D A I E E I S D H I T N L K R V
631  TGGTACAGTCTTGGAGAGTACATGTATGACAAGGAGACCATGAGCAGTTAGACATGCTGCATTAAGAC
      G T G L G E Y M Y D K E T M S S *
701  AGTCTATTTTAGTGCTTTTATTATTTACACAGTGTGAACACTTATTGATATTTGGAGATAAAATACT
771  TGACAAAATTAACATTCCTTTTACATTAATAAATCTTGTCTTTTAAACGAAACAAATATTGGTTGAATT
851  CGTTTAGAAAAAGGACTGCATATAATTTACAAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA

```

图 5 泥蚶 ferritin 全长序列

Fig.5 Nucleotide sequence of the ferritin encoding cDNA from *T. granosa* and its deduced aminoacid sequence

注: 方框线内表示起始密码子; “*”表示终止子; 下划线表示多聚腺苷酸化信号; “#”表示亚铁氧化酶活性中心的氨基酸残基; “ ” 的表示亲水集团中心的氨基酸残基; “ ” 的表示铁离子通道的氨基酸残基; 阴影部分表示结合铁离子的氨基酸残基

3 讨论

3.1 cDNA 文库

从 Hofstetter 等(1976)成功构建了第一个 cDNA 文库以来, 构建 cDNA 的技术方法经历了一个逐步发展完善的过程。cDNA 文库的构建方法有: 经典 cDNA 文库、标准化 cDNA 文库、消减 cDNA 文库、染色体区域特异性 cDNA 文库、PCR cDNA 文库与 RACE cDNA 文库、固相 cDNA 文库等(杨成君等, 2007; Figueiredo *et al*, 2007)。cDNA 文库筛选是获取基因全长 cDNA 的基本方法之一, 基因全长 cDNA 的获取是研究酶的结构与功能的关系、基因表达和调控、基因工程应用的重要前提(栾慎顺等, 2007; 孙朝晖等, 2005; 唐勇等, 2005; Ruszczyk *et al*, 2008)。cDNA 仅占基因组 DNA 的 3%左右, 都是性状表达的有用序列。因此, 在基因工程研究中, 真核细胞的 cDNA 文库往往比基因组文库更为有用。随着 cDNA 文库构建技术的日益成熟和普及, 近年来已经成为各实验室克隆相关性状基因的一种首选方法。

本研究中采用 SMART 技术构建泥蚶 cDNA 文库, 通过随机测序获得一系列基因序列, 尤其是免疫相关基因的获得对泥蚶抗病性的研究及优良品种的选育等有极为重要的意义。目前我国的贝类免疫学研究相对于养殖业还处于严重滞后状态, 对泥蚶相关抗性基因序列的获得, 如热休克蛋白、SOD、铁结合蛋白等, 对这些基因在泥蚶应激环境中表达的研究有助于进一步了解泥蚶免疫相关知识, 对邻近物种的研究也有帮助, 可促进贝类免疫学的发展。另外, 一些信号转导类基因、结构基因、代谢相关基因等序列的获得都可为对泥蚶的深入研究做铺垫。

3.2 序列分析

在获得的已知基因从编码蛋白的功能上可分为与细

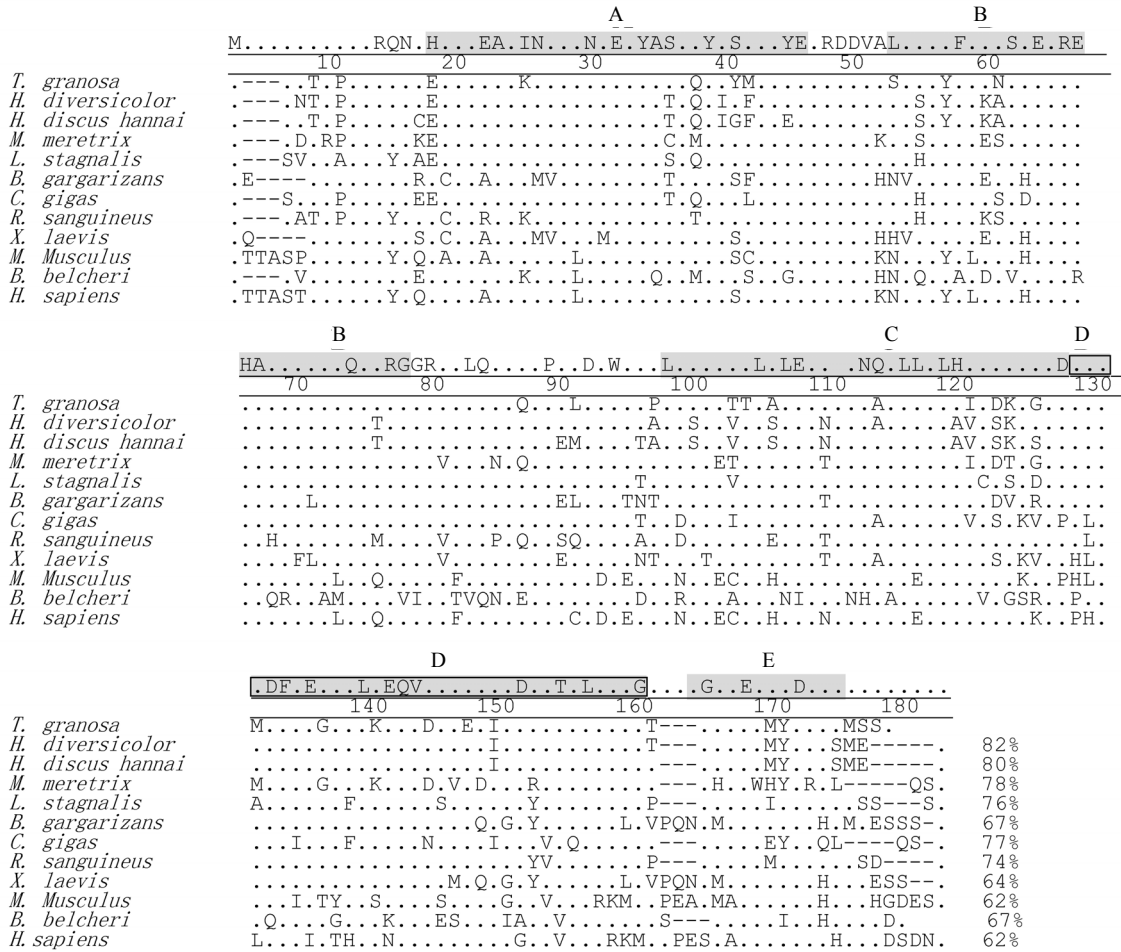


图 6 泥蚶铁结合蛋白基因序列与其它物种间的同源性分析

Fig.6 The comparison of *T. granosa* in ferritin polypeptide sequence with other orthologues

注：“.”表示相同的氨基酸；“-”表示优化比对后出现的间隔；字母表示氨基酸发生替换；A、B、C、D、E五个阴影或带框阴影表示铁结合蛋白二级结构时所具有五个螺旋结构所在的位置；序列后的百分比表示各物种间铁结合蛋白氨基酸序列与泥蚶铁结合蛋白基因序列的同源性

胞有丝分裂及增殖、维持细胞骨架、信号转导、细胞运输、转录控制、生化代谢、免疫调节等多个方面。由于目前关于泥蚶及其邻近物种在分子生物学方面的研究较少，有些关于鲍(Kim *et al*, 2007)、扇贝(Gao *et al*, 2008)等的研究也只是局限于一些较为基本的抗性基因，如热休克蛋白 70(HSP70)、热休克蛋白 90(HSP90)、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 等，因此对泥蚶的序列分析带来了一定的困难。一些看家基因如肌动蛋白(actin)、16S 核糖体蛋白(16S rRNA)等，以及保守性较好的基因如精氨酸激酶(arginine kinase)、细胞色素(cytochrome)、ATP 激酶(ATP synthase)等，比对结果均在 90%以上。对于在进化过程中变异较大的基因，就无法通过比对来确定基因类型。在泥蚶的测序结果中有 87 条序列作者无法确定其基因类型，占总测序

结果的 19%左右。对于这些基因的确定，就需要通过其它方法作进一步的深入研究。

3.3 铁结合蛋白(ferritin)

Ferritin 有一条重链和一条轻链组成。重链主要是在蛋白分子中心形成一个亚铁氧化酶活性中心，摄取 Fe²⁺将其氧化成 Fe³⁺，然后在亲水集团中心把 Fe³⁺形成 5Fe₂O₃ · 9H₂O 或磷酸铁结晶水的形式通过铁离子通道运送到轻链富集并存储起来(Hempstead *et al*, 1997)。将获得的氨基酸序列与软体动物(文蛤、杂色鲍、太平洋牡蛎等)、两栖类(中华蟾蜍、非洲爪蟾)、鱼类(文昌鱼)和哺乳动物(小家鼠、人)的铁结合蛋白重链的相似性进行比较，相似性均在 60%以上，显示了高度的同源性，说明该蛋白属于铁结合蛋白重链，且在进化过程中高度保守。同时也在序列上找

到了相应的铁结合位点、二级结构中的 5 个螺旋环及三个功能结构域,进一步证明了该蛋白为铁结合蛋白重链。

Ferritin 不仅仅是一种铁调节蛋白,在对外界应激及病害侵染时还可起到细胞防御作用(Masuda *et al.*, 2007)。近年来,人们对它的研究也不再局限于对铁调节的研究,转而更侧重于免疫防御功能上的研究,如酸碱胁迫后南美白对虾(*Litopenaeus vannamei*)体中 ferritin 的表达情况(Zhou *et al.*, 2008), ferritin 在心肌细胞中对细胞坏死及氧化调节中的作用(Omiya *et al.*, 2009)及在免疫系统中的其它作用(Recalcat *et al.*, 2008)。泥蚶 ferritin 基因全长的获得后,今后可对此作进一步的研究,通过原核表达、Western blotting、荧光定量 PCR 等方法系统研究其蛋白物理性质,如实际分子量、等电点等,以及在不同条件下该基因在泥蚶体内的表达情况等。

参 考 文 献

- 王万东, 2008. 东山湾云霄海区泥蚶生态习性和养殖技术. 养殖与饲料, 1: 81—83
- 王日昕, 李太武, 吕振明等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究. 海洋与湖沼, 36(3): 227—234
- 孙朝晖, 郑文岭, 彭翼飞等, 2005. cDNA 文库法在 HCV-1b 监测芯片研制中的应用. 中国生物化学与分子生物学报, 21(3): 415—420
- 苏秀榕, 吕振明, 李太武等, 2005. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)个体发育过程中同工酶基因表达与调控的研究. 海洋与湖沼, 36(1): 81—87
- 杜莉利, 李太武, 苏秀榕等, 2008. 可口革囊星虫(*Phascoloma esculenta*)铁结合蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 39(3): 252—256
- 李太武, 李成华, 宋林生等, 2003. 5 个泥蚶群体遗传多样性的 RAPD 分析. 生物多样性, 11(2): 118—124
- 杨成君, 王 军, 2007. cDNA 文库的构建策略及其应用. 生物技术通报, 1: 5—9
- 竺俊全, 杨万喜, 石钢德, 2002. 泥蚶精子的超微结构. 浙江大学学报(理学版), 29(3): 423—427
- 贾玉海主编, 1996. 中国海洋湖沼药理学. 北京: 学苑出版社, 128
- 栾慎顺, 张敬武, 刘恒贵, 2007. 正常人肝细胞 cDNA 文库的构建及应用分析. 生物技术通报, 6: 135—137
- 唐 勇, 陈焕春, 黄勤锋等, 2005. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 cDNA 文库的构建及基因组序列的测定. 中国病毒学, 20(2): 203—205
- 曹 华, 蒋建斌, 曹红军, 2006. 泥蚶人工育苗及滩涂养成技术研究. 齐鲁渔业, 23(4): 1—5
- 董美强, 2000. 关于泥蚶人工育苗技术的探讨. 齐鲁渔业, 17(2): 17—18
- 蔡福龙, 陈英黄, 凌 毅, 1991. 若干化学毒物对泥蚶吸收 ^{45}Ca 的影响. 海洋学报, 13(1): 91—95
- Dunkov B C, Georgieva T, 1999. Organization of the ferritin genes in *Drosophila melanogaster*. DNA and Cell Biology, 18(12): 937—944
- Figueiredo A, Balde A, Cardoso H *et al.*, 2007. Cost effective method for construction of high quality cDNA libraries. Biomolecular Engineering, 24: 419—421
- Gao Q, Zhao J, Song L S *et al.*, 2008. Molecular cloning, characterization and expression of heat shock protein 90 gene in the haemocytes of bay scallop *Argopecten irradians*. Fish & Shellfish Immunology, 24: 379—385
- Hempstead P D, Yewdall S J, Fernie A R *et al.*, 1997. Comparison of the three-dimensional structures of recombinant human H and horse L ferritins at high resolution. J Mol Biol, 268: 424—448
- Hofstetter H, Schamböck A, Van Den Berg J *et al.*, 1976. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA) · poly(dT) method. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis, 3(454): 587—591
- Kim K Y, Lee S Y, Cho Y S *et al.*, 2007. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese superoxide dismutases in disk abalone, *Haliotis discus discus*. Fish & Shellfish Immunology, 23: 1043—1059
- Kim T Y, Joo J, Kang S Y *et al.*, 2002. *Paragonimus westermani*: molecular cloning, expression, and characterization of a recombinant yolk ferritin. Experimental Parasitology, 102: 194—200
- Levy F, Rabel D, Charlet M *et al.*, 2004. Proteomic analysis of the systemic immune response of *Drosophila*. Molecular & Cellular Proteomics, 3(2): 156—166
- Masuda T, Goto F, Yoshihara T *et al.*, 2007. Construction of homo- and heteropolymers of plant ferritin subunits using an *in vitro* protein expression system. Protein Expression and Purification, 56: 237—246
- Omiya S, Hikoso S, Imanishi Y *et al.*, 2009. Downregulation of ferritin heavy chain increases labile iron pool, oxidative stress and cell death in cardiomyocytes. Molecular and Cellular Cardiology, 46: 59—66
- Recalcat S, Invernizzi P, Arosio P *et al.*, 2008. New functions for an iron storage protein: The role of ferritin in immunity and autoimmunity. Autoimmunity, 30: 84—89
- Ruszczyc A, Joerink M, Guldenaar C *et al.*, 2008. cDNA expression library screening and identification of two novel antigens: Ubiquitin and receptor for activated C kinase (RACK) homologue, of the fish parasite *Trypanosoma carassii*. Fish & Shellfish Immunology, 25: 84—90
- Wang D, Kim B Y, Lee K S *et al.*, 2009. Molecular characteriza-

tion of iron binding proteins, transferrin and ferritin heavy chain subunit, from the bumblebee *Bombus ignitus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 152: 20—27

Zhou J, Wang W N, Ma G Z *et al*, 2008. Gene expression of ferritin in tissue of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* after exposure to pH stress. Aquaculture, 275: 356—360

CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY WITH *TEGILLARCA GRANOSA* MUSCULAR TISSUE AND SEQUENCE ANALYSIS OF FERRITIN GENE

HE Jing-Jing¹, LI Ye¹, LI Tai-Wu¹, SU Xiu-Rong¹, WANG Meng-Qian¹,
LI Song-Wei¹, ZHOU Jun¹, MA Bin¹, LI Qiang-Fang²

(1. Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ocean and Fisheries Bureau of Yangjiang City of Guangdong Province, Yangjiang, 529500)

Abstract Total RNA from muscular tissue of healthy *Tegillarca granosa* was isolated, and the mRNA was separated and purified. The CDS primer with Sfi was induced into the first cDNA strand with the aid of reverse transcriptase, and then the double strand cDNA was synthesized through LD-PCR (Long-Distance-PCR), after removing the short fragments of dsDNA. After being ligated with pDNR-LIB vector, plasmids were transformed into DH10B by electric conversion. The titer of primary cDNA library was 3.17×10^5 cfu/ml and the rate of recombination was above 86.3%. The insert size ranged from 0.3—2.5kb; and 458 clones were sequenced. The sequencing results show that there were 94 known and 87 unknown kinds of genes in total. By comparing its homologues in the NCBI database with BlastN program, a full-length cDNA was found, i.e., the gene for ferritin, which is 895bp long, and includes a 163bp long 5'-untranslated region (UTR), ORF encoding 172 amino acids, and a 213bp long 3'-UTR; the molecular weight predicted is 20kDa; and theoretical isoelectric point of 4.89. The amino acids sequence was compared with *Halotis discus hannai*, *Crassostrea gigas*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Branchiostoma belcheri*, *Bufo gargarizans*, *Xenopus laevis*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, etc, reaching high similarities of 62%—82%. Therefore, the ferritin is a highly conserved gene.

Key words cDNA library, Sequence analysis, *Tegillarca granosa*, Ferritin gene