

# 中华鳖(*Pelodiscus sinensis*)肝脏 cDNA 文库的构建和 EST 序列的初步分析\*

张海琪<sup>1,2</sup> 何中央<sup>2</sup> 邵健忠<sup>1</sup> 钱国英<sup>3</sup> 张超<sup>2</sup>

(1. 浙江大学生命科学学院 杭州 310058; 2. 浙江省水产技术推广总站 杭州 310012;  
3. 浙江万里学院 宁波 315100)

**提要** 采用 Superscript cDNA 全长文库构建法构建了高质量的中华鳖肝脏 cDNA 文库, GO 法对 ESTs 进行注释。结果表明, 文库容量为  $2.982 \times 10^6$  CFU/ml, 重组率 93%, 平均插入片段约为 1kb。测序获得了 4146 个有效序列, 发现 1957 条单基因簇, 包括 404 个序列重叠群和 1553 条单一序列。279 个基因簇得到基因注释, 发现了多种与育种价值相关的基因, 如泛素、热休克蛋白等抗逆基因、金属硫蛋白等抗金属基因、超氧化物歧化酶、CD9 等免疫相关基因, 为中华鳖分子遗传学研究、种质资源评价和分子选育等奠定了基础。

**关键词** 中华鳖, 肝脏, cDNA 文库, EST, 抗菌肽基因  
**中图分类号** S941

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*), 隶属鳖科 (Trionychidae)、鳖属 (*Pelodiscus*), 是我国重要的经济水生动物, 其养殖业已在我国得到快速发展, 尤以浙江省发展最为迅猛。2011 年浙江省中华鳖养殖产量达 12.38 万 t, 产值逾 70 亿元, 已成为浙江省第一大主导品种。然而在近几年的养殖发展过程中, 每年都发现有中华鳖暴发性死亡现象发生, 主要特征表现为鼻孔、肛门流血, 腹部白色, 颈脖肿大。疾病来势凶猛且传染迅速, 死亡率高, 造成惨重损失, 严重制约了中华鳖养殖的健康发展, 因此加强中华鳖基础生物学方面的研究迫在眉睫(胡广洲, 2010)<sup>1)</sup>。

cDNA 文库的构建和 EST 测序分析是研究动物基因转录组学和分离基因最快速有效的技术。通过构建 cDNA 文库不仅可保护基因资源, 而且可以通过测序获得大量有研究和开发价值的新基因。目前, 已有大西洋三文鱼 (*Salmo salar*) (Adzhubei *et al*, 2007)、大西洋比目鱼 (*Hippoglossus*) (Susan *et al*, 2007)、虹鳟 (*Salmo gairdnerii*) (Govoroun *et al*, 2006)、鲤 (*Cyprinus*

*earpio* L.) (Savan *et al*, 2002)、仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) (徐赛涛等, 2007)、厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) (王日昕等, 2009)、虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) (李云峰等, 2010) 和红笛鲷 (*Lutjanus sanguineus*) (张新中等, 2011) 等多种水生生物 cDNA 文库的相关研究报道。在中华鳖方面, 郑济芳等 (2005) 构建了中华鳖孵化一周胚胎的肾脏/尿生殖嵴混合组织的 cDNA 文库, 鉴定了与发育相关的基因; 周秀霞等 (2007) 构建了嗜水性气单胞菌感染的中华鳖主要器官差减 cDNA 文库, 分离鉴定了与细菌感染相关的免疫基因。肝脏是动物体内最大的腺体, 肝细胞 mRNA 含量高, 组成丰富, 是机体免疫和代谢相关基因的重要来源, 因此, 肝脏常用于 cDNA 文库构建。本文采用 Superscript cDNA 全长文库构建技术建立中华鳖肝脏组织的 cDNA 全长文库, 并进行 EST 测序分析, 以期在短期内获得大量中华鳖肝脏组织的功能基因表达信息, 为深入了解功能基因在中华鳖肝脏组织中的表达提供分子生物学依据, 为从分子水平理解和调

\* 浙江省水产新品种选育重大科技专项资助项目“中华鳖新品种选育技术集成与示范”, 2012C12907-1 号; 浙江万里学院省重中之重学科开放基金资助项目, KF2011003 号。张海琪, 在职博士研究生, 高级工程师, E-mail: zmk407@126.com

1) 胡广洲, 2010. 中华鳖暴发性败血症的研究. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 1—10

收稿日期: 2012-05-26, 收修改稿日期: 2012-07-15

控中华鳖的免疫相关因子的分子多样性及免疫机制奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物及主要试剂

中华鳖取自浙江省杭州萧山区省级中华鳖日本品系良种场, 体质量 600—750g。取中华鳖肝脏组织保存于 RNA 保护剂中,  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存备用。总 RNA 提取试剂盒、mRNA 分离试剂盒和 cDNA 文库构建试剂盒购自 Invitrogen 公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

### 1.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

取中华鳖肝脏组织, 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, 取少量提取液进行琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量, 紫外检测 RNA 纯度及浓度。总 RNA 于  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存或按照 mRNA Purification Kit 说明纯化 mRNA。

### 1.3 cDNA 文库的构建

取  $1.0\mu\text{l}$  纯化的 mRNA 按 Invitrogen 公司 Superscript Full length library construction kit II 说明书进行。将含有 cDNA 的质粒载体转化感受态细胞 DH10B。检测文库质量合格后, 向转化细胞中加入 50% 的甘油, 混匀后放入  $-80^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存。

### 1.4 cDNA 文库的鉴定

库容量测定: 取转化后细菌原液( $1\text{ml}$ ) $10\mu\text{l}$  稀释 1000 倍后, 从中取出  $50\mu\text{l}$  涂布 LB 平板(含相应抗性),  $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 计算每个平板上的克隆数。

$$\text{总克隆数 CFU} = \frac{\text{平板上的克隆数}}{50\mu\text{l} \times 1000 \text{ 倍}} \times 1 \times 10^3 \mu\text{l}$$

插入片段检测: 用灭菌处理过的牙签在  $30\mu\text{g}/\text{ml}$  的氯霉素 LB 平板上随意挑选 50 个克隆  $1\text{ml}$  LB 液体培养基中,  $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 用 M13 引物 PCR 扩增后凝胶电泳检测 PCR 结果。

重组率计算: 对随机挑取的 50 个单克隆 PCR 扩增后, 计算重组克隆和非重组克隆的比值, 确定重组率。

### 1.5 ESTs 序列测定和初步分析

使用 Cross-match 软件去掉 EST 中的低质量序列、载体序列、重复序列等, 使用 Phrap 序列拼接软件将测序得到的 EST 拼接成重叠群并使用 Consed 软件做人工检查和校正, 用 BlastX 程序将 EST 序列与 NCBI 的非冗余蛋白序列数据库(NR)进行比对。利用 Blast2GO 软件对所有 ESTs 进行基因功能分析及序列长度、E 值的统计, 并对单基因簇(Unigene)按分子

功能进行分类。

### 1.6 抗菌肽基因的生物信息学分析

将抗菌肽基因 cDNA 的 ORF 序列输入 NCBI 网络数据库, 进行基因序列比对。用 Expasy 在线软件对该基因 cDNA 的 ORF 序列进行翻译, 并对翻译的蛋白质序列进行结构和性质的预测(<http://au.expasy.org>)。

## 2 结果

### 2.1 中华鳖肝脏总 RNA 的提取和总 mRNA 的纯化

采用 Trizol Reagent 提取获得中华鳖肝细胞总 RNA, 经紫外分光光度计分析表明,  $OD_{260}/OD_{280}$  介于 1.85—2.0 之间, 表明纯度较高。经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测(图 1), 28s RNA 和 18s RNA 两条带明显可见。利用 poly(T)纤维素柱进行亲和层析从总 RNA 中分离获得纯度很高的 mRNA, 可作为逆转录 cDNA 第 1 链的有效模板。

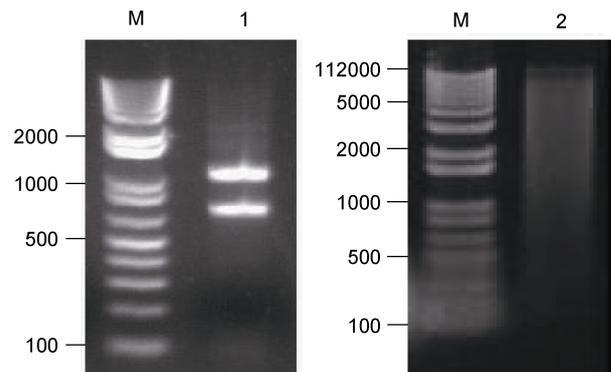


图 1 中华鳖肝脏总 RNA(左)和 mRNA(右)的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 Total RNA (left) and purified mRNA (right) from the liver of *P. sinensis*

M: DNA Maker; 1: 总 RNA; 2: mRNA

### 2.2 中华鳖肝脏 cDNA 文库的质量鉴定

#### 2.2.1 文库滴度 CFU 的鉴定(图 2)

$$\frac{\text{平板上的克隆数}}{0.5\mu\text{l} \times 1000 \text{ 倍}} = \frac{497}{0.5\mu\text{l} \times 1000} = 0.994 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$$

$$\text{总克隆数 CFU} = 0.994 \times 10^6 \text{ CFU/ml} \times 3\text{ml} = 2.982 \times 10^6$$

2.2.2 菌落 PCR 验证鉴定平均插入片段及重组率经菌落 PCR 验证, 得出平均插入片段约为 1.0kb(图 3), 经蓝白筛选计算出文库重组率为 93%。

### 2.3 EST 测序结果的初步分析

2.3.1 EST 序列测定与拼接 本试验采用 MegaBACE 仪器共对 4500 个克隆进行了 5'测序, 对

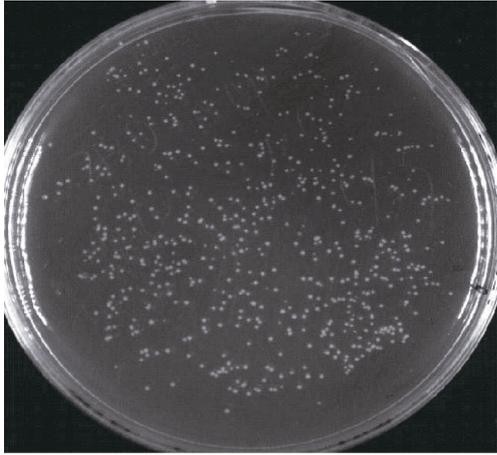


图2 中华鳖肝脏 cDNA 文库平板鉴定

Fig.2 Plate identification of the cDNA library from the liver of *P. sinensis*

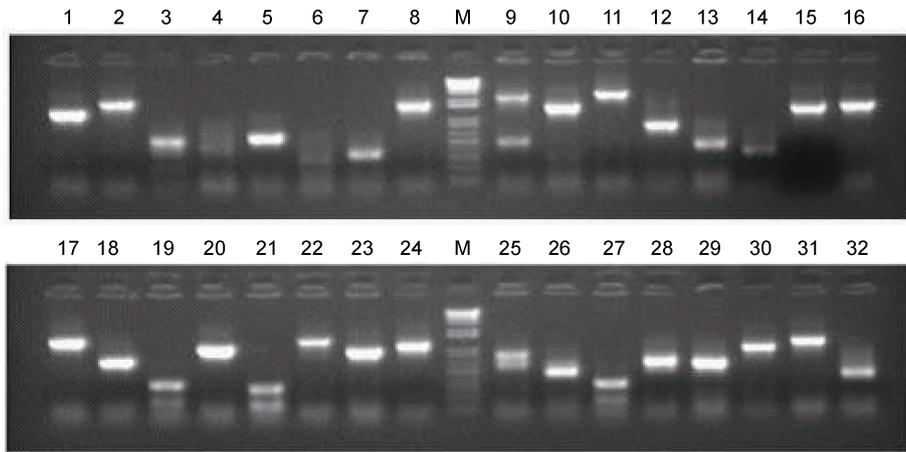


图3 部分菌落的 PCR 电泳检测结果

Fig.3 Electrophoresis of partial clone PCR

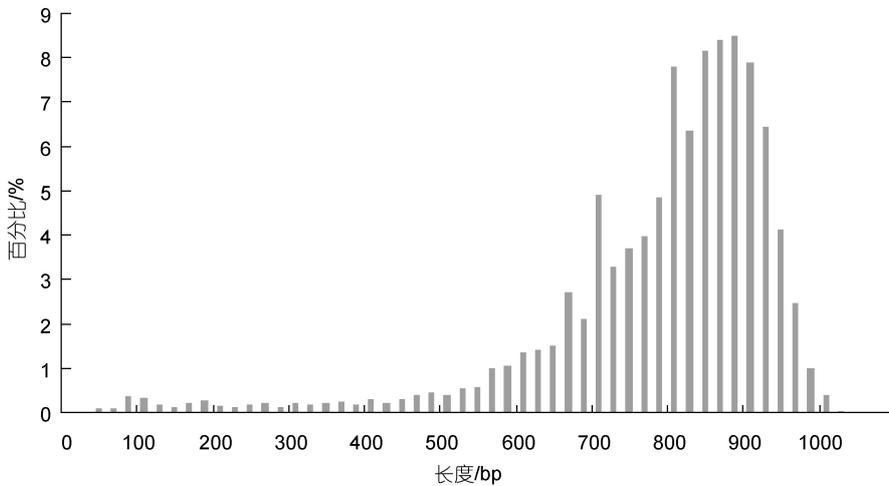


图4 EST 长度分布

Fig.4 Distribution of EST length

测序数据进行了基本处理, 包括去除载体、污染、100bp 以下的低质量序列等, 最终共获得高质量序列 4146 条。ESTs 序列长度主要集中在 100—1000bp 之间, 具体分布情况见图 4。

**2.3.2 Unigene 寻找、拼接、分类及 ORF 寻找** 使用 Phrap 在默认参数下进行 EST 拼接, 得到 404 个跨叠群(contig)和 1553 个单条序列(singlet), 共计 1957 条单基因簇(unigene), 具体分布如表 1 所示, 其中 unigene 最多包含 198 条 EST。条单基因簇平均长度为 669.74bp。利用开放阅读框查找软件(ORF Finder)共获得有效 ORF 1699 条, 得蛋白氨基酸序列 1699 条。

**2.3.3 COG 分析** 对所有 Unigenes 进行生物信息学分析(Blastx,  $E < e^{-5}$ ), 279 条序列(16.4%)被认为与公布在公共网络数据库中的已知基因具有显著相似性, 其余序列为未知基因。通过 GengOntology 法分类, 对

获得注释的 279 个 ESTs 按功能进行分类(表 2), 发现负责翻译、核糖体结构和生物发育基因的 ESTs 丰度最高, 有 74 条(占比为 26.52%); 转录后修饰、蛋白质折叠、伴侣和和能量产生与转化相关的次之, 分别为 50 条(占比为 17.92%)和 34 条(占比为 13.26%); 脂类转运与代谢、氨基酸转运与代谢以及糖类转运与代谢相关的分别为 14 条(占比为 5.02%)、14 条(占比为 5.02%)和 10 条(占比为 3.58%); 信号传导、无机离子转运与代谢和次级代谢产物合成、转运及分解分别为 7 条(占比为 2.51%)、5 条(占比为 1.79%)和 5 条(占比为 1.79%); 复制、重组和修复, 细胞膜包膜合成, 细胞骨架, 细胞内转运、内分泌和囊泡转运以及转录相关的均为 4 条(各占 1.43%); 核苷转运与代谢、辅酶转运与代谢相关基因的丰度较低, 分别为 3 条(占比为 1.08%)和 2 条(占比为 0.72%), 细胞周期控制、细胞分裂与染色体分离和 RNA 加工与修饰相关基因各 1 条(各占

表 1 单基因簇分布  
Tab.1 Distribution of unigenes length

大小	数量(个)	百分比(%)	大小	数量(个)	百分比(%)
1	1553	79.4	11—20	15	0.8
2	217	11.1	21—50	12	0.6
3	61	3.1	51—100	5	0.3
4—5	49	2.5	>100	2	0.1
6—10	43	66			

表 2 GO 法分类预测的 ESTs 功能分类、数量和百分比  
Tab.2 Classification of function, number and percentage of ESTs by GO analysis

功能分类	数量(个)	百分比(%)
翻译、核糖体结构和生物发育	74	26.52
转录后修饰、蛋白质折叠、伴侣	50	17.92
能量产生与转化	37	13.26
仅有预测功能	34	12.19
脂类转运与代谢	14	5.02
氨基酸转运与代谢	14	5.02
糖类转运与代谢	10	3.58
信号传导	7	2.51
无机离子转运与代谢	5	1.79
次级代谢产物合成、转运及分解	5	1.79
复制、重组和修复	4	1.43
细胞膜包膜合成	4	1.43
细胞骨架	4	1.43
细胞内转运、内分泌和囊泡转运	4	1.43
转录	4	1.43
核苷转运与代谢	3	1.08
功能未知	2	0.72
辅酶转运与代谢	2	0.72
细胞周期控制、细胞分裂与染色体分离	1	0.36
RNA 加工与修饰	1	0.36

0.36%)。表 3 列出了部分育种相关基因的比对结果。

#### 2.4 抗菌肽基因的序列分析

获得了完整的肝脏表达的抗菌肽基因的完整的开放阅读框(图 5)。从图 5 可以看出, 开放阅读框长度为 231bp, 共编码 77 个氨基酸残基, 包含 8 个半胱氨酸残基, 它们之间可形成 4 对二硫键, 以稳定蛋白质的高级构象; 此外还包含 2 个脯氨酸残基, 在抗菌作用中发挥着重要作用。

### 3 讨论

cDNA 约占基因组 DNA 的 3%, 均为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 文库常比基因组文库更为有用。随着 cDNA 文库构建技术的日益成熟, 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。目前构建 cDNA 文库的方法有经典 cDNA 文库、标准化 cDNA 文库、消减 cDNA 文库、染色体区域特异化 cDNA 文库、PCR cDNA 文库、RACE cDNA 文库、固相 cDNA 文库等(晏慧君等, 2006)。为了得到具有研究价值的编码基因, 尤其是一些与中华鳖免疫防御机制相关的基因, 本研究构建了中华鳖肝脏组织全长 cDNA 文库。从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看, 所提取的 RNA 完整性较好。cDNA 文库的库容量为  $2.952 \times 10^6$  CFU/ml, 表明所建文库的质量符合要求; 其次, 用 PCR 法随机检测插入片段, 大部分片段都大于 500bp, 平均长度约 1.0kb, 可用于后续研究。

目前我国中华鳖分子生物学研究相对养殖业还处于严重滞后状态, 有关中华鳖生长繁育致病分子机理也未清楚, 分子育种研究比较落后。本研究获得了 1957 条单基因簇, 包括 404 个序列重叠群和 1553 条单一序列, 通过 COG 法可将有功能注释的 279 个基因分为蛋白质合成、细胞骨架、细胞信号传导、代谢、转运、能力、转录、抗病及防御等方面, 发现多种与育种价值相关的基因, 如泛素、热休克蛋白等抗逆基因、金属硫蛋白等抗金属基因、超氧化物歧化酶、CD9 等免疫相关基因。可见, 通过构建中华鳖肝脏 cDNA 文库, 可实现短期内获得大量中华鳖肝脏组织的功能基因表达信息, 为筛选抗逆性状的主效基因、了解生长发育中的表达调控等奠定基础。

本研究的主要意义除为中华鳖防病、抗病以及遗传育种工作提供了重要的理论基础外, 还在于某些重要的免疫防御相关功能基因的发现可以直接运用到生产实践当中。如热休克蛋白等可以作为高效的分子标记, 应用于养殖和生态学的研究, 以监测其生长环境中物理化学条件的变化, 更好地指导养殖生产。中华鳖肝脏表达的抗菌肽 EST 序列与 NCBI 数据库中火鸡的同源达 64% (Lynn *et al*, 2004), 抗菌肽是一类在动物的防御机制中广泛参与抵抗病原菌感染的具有阳离子微粒的生物活性肽(Chongsiriwatana *et al*, 2008), 大部分生物利用其自身的抗菌肽作为抵御微生物入侵的第一道防线(Hancock *et al*, 2006)。抗菌肽可以抑制细胞壁、核酸、蛋白质等物质的合成和抑制某些酶的活性, 从而杀死入侵的病原微生物(Vazquez *et al*, 2009)。近年来, 高密度、集约化的养殖方式使水产动物疾病加剧, 因此通过将抗菌肽基因导入水

表 3 部分育种相关基因在 GenBank 中的同源性比较结果  
Tab.3 Comparison of homology with partial breeding-relevant genes identified in GenBank

推测的同源基因	相似物种	长度(bp)	期望值
金属硫蛋白	<i>Zootoca vivipara</i>	456	3e-11
凝溶胶蛋白	<i>Gallus gallus</i>	786	1e-44
钙调节蛋白	<i>Taeniopygia guttata</i>	425	1e-36
铁蛋白	<i>Salmo salar</i>	800	1e-7
锌金属蛋白	<i>Gallus gallus</i>	775	5e-59
热休克蛋白 70	<i>Alligator mississippiensis</i>	720	1e-109
硫氧还原蛋白	<i>Gallus gallus</i>	672	8e-40
超氧化物歧化酶	<i>Taeniopygia gutta</i>	728	7e-64
细胞色素 C 氧化酶 I	<i>Pelodiscus sinensis</i>	1626	0
胰脂肪酶	<i>Anolis carolinensis</i>	750	2e-98
NADH 脱氢酶	<i>Pelodiscus sinensis</i>	997	0
抗冻蛋白	<i>Gallus gallus</i>	3638	1e-123
泛素	<i>Anser anser</i>	819	1e-147
细胞色素 P450	<i>Alligator mississippiensis</i>	2111	1e-160
TNF 受体相关因子	<i>Taeniopygia guttata</i>	828	8e-21
CD9	<i>Pelodiscus sinensis</i>	1317	7e-47
核糖体蛋白 L3	<i>Gallus gallus</i>	1082	1e-166
核糖体蛋白 L7	<i>Taeniopygia guttata</i>	657	1e-165
核糖体蛋白 L18	<i>Anolis carolinensis</i>	603	1e-91
核糖体蛋白 L23	<i>Pelodiscus sinensis</i>	384	3e-16

1 CATAAGACATAAAACCCCTTATTGGATTGTTACAGAACAAGAGTGTTCACACAACATTTTACATAGCATGACTT  
 76 CTGGAGAGTAGGGTTTATCCCTGTTAAGCGTAGATTGCAATTTAACTAAAACCATTAAGGAGCAGTATGGCAGG  
 151 CCAATACAAGCCAGCCATCCTTATGAGTTTACAAGCTGGTCTCTAAGTCTCTCTAAAACCAGTCAAGTAGGA  
 226 AAAGATCTTGTTTCACTTACATGATCTTTATTGTATATTGGGATATACACTTAACTTTGCAATACAAGTCCCTAC  
 301 TTAGAATAGGCAGCTACAATTGTAGGTTATGCCTGTCACTTCAATAATGGTGTACAGTACGTGAAAATATTCCT  
 376 CTGGTTCTTTTCCATCTCCAAGGGCAGCAAGGAAGCCTTCTGTCTCTCTCTGAGCTAAGGCAGCTAGGGACT  
 451 TGAATGTCTTCGGCTCATAAATAGCCAGATCAGCAAGCATTTTCTTATTCAGGACTCCAGCCCTCCACAAAATG  
 526 TTACTAGTAACTAGCAGCCTATCCAAAGAAGATGTCAGTGTGAAAGTTATAGCACTTCTACTGTTTTGTGCAGC  
 1 M Q C L K V I A L L L F C A A  
 601 CCTACTGACGCAGACACTGTGCTTCTTTGCATCATTAAGCTCACAACAAAGACAAAGGAGGATGACTCC  
 16 L L T Q T H C A S L H H S S S Q L T R Q R R M T P  
 676 TTTCTGGAGGGGATTCCCTCAGACCTATAGGAGCATTATGCAAGCATGACAATGAATGCATCTCAATGCTGTG  
 41 F W R G I S L R P I G A L C R H D N E C I S M L C  
 751 CAGGAAGAATCGTGTTCCCTAAGAAATTTCTGTGAGTGAACCTGTACAGAAAGAAGATAATTTGTTTTACCTC  
 66 R K N R C S L R I S C E \*  
 826 TGACAATGTCTACCCTATATATGAAATATTTATTATCAACTATCCTTAAGTGAGGACACTTTGAATTATGCAAC  
 901 TGCATATATTTAATATTTTAAAGATGAACATTTGTTGTATGAAATGATATAAGGGTTTCATGAAAGTTGAAACAA  
 976 TGCTCTGGTCTGGGCTCTGAAGACATGCTCAATAGAAGACCTTGCAAGTTTTTAAATTGTTCTTTTTTCTATA  
 1051 AGATAAAGATTTGTATTTAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

产动物体内使其得到表达，从而培育出具有更多优势的抗病品种，已逐渐成为育种研究的热点。Sarmasik 等(2003)将抗菌肽基因导入青鳉中，转基因个体具有比未转导抗菌肽基因对照组更高的抗菌活性。Dunham 等(2003)把从家蚕中分离到的抗菌肽基因利用电穿孔的方法导入斑点叉尾鲴受精卵中，发现可提高转基因鱼的抗菌活性。Chiou 等(2009)将中国仓鼠卵巢细胞株中生物合成的重组抗菌肽导入罗非鱼体内，可以有效地控制感染哈氏弧菌罗非鱼的炎症发生并能降低其死亡率。今后还需深入开展中华鳖抗菌肽基因表达载体

图 5 中华鳖肝脏表达抗菌肽基因的 cDNA 开放阅读框序列及演绎的氨基酸序列

Fig.5 Open reading frame sequence and its amino acid sequence of liver expressed antibacterial peptide gene in *P. sinensis*

构建及提高抗菌表达稳定性等研究, 从而为培育中华鳖抗病育种研究奠定重要基础。

### 参 考 文 献

- 王日昕, 廖 智, 刘 梅, 等, 2009. 厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)血细胞 cDNA 文库的构建及部分 EST 序列分析. 海洋与湖沼, 40(5): 603—607
- 李云峰, 刘卫东, 高祥刚, 等, 2010. 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析. 中国水产科学, 17(3): 578—585
- 张新中, 吴灶和, 简纪常等, 2011. 红笛鲷头肾消减 cDNA 文库的构建与分析. 中国水产科学, 18(2): 379—391
- 周秀霞, 黄 容, 郭琼林, 2007. 嗜水气单胞菌感染的中华鳖主要器官差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 31(4): 509—515
- 郑济芳, 朱睦元, 2005. 中华鳖孵化一周胚胎的肾脏/尿生殖嵴混合组织的 cDNA 文库构建与特征. 动物学报, 51(6): 1156—1161
- 晏慧君, 黄兴奇, 程在全, 2006. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展. 云南农业大学学报, 21(1): 1—6
- 徐赛涛, 丛丽娜, 朱蓓薇, 2007. 仿刺参 cDNA 文库构建以及序列分析. 中国水产科学, 14(7): 7—11
- Adzhubei A A, Vlasova A V, Hagen-Larsen H *et al*, 2007. Annotated expressed sequence tags (ESTs) from pre-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) in a searchable data resource. BMC Genomics, 8: 209
- Chiou M J, Chen L K, Peng K C *et al*, 2009. Stable expression in a Chinese hamster ovary (CHO) cell line of bioactive recombinant chelonianin, which plays an important role in protecting fish against pathogenic infection. Developmental and Comparative Immunology, 33: 117—126
- Chongsiriwatana N P, Patch J A, Czyzewski A M D *et al*, 2008. Peptoids that mimic the structure, function, and mechanism of helical antimicrobial peptides. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 2794—2799
- Dunham R A, Warr G W, Nichols A, 2003. Enhanced bacterial disease resistance of transgenic channel catfish possessing eeeropin genes. Marine Biotechnology, 5(3): 330—338
- Govoroun M, Le Gac F, Guiguen Y, 2006. Generation of a large scale repertoire of Expressed Sequence Tags (ESTs) from normalised rainbow trout cDNA libraries. BMC Genomics, 7: 196
- Hancock R E W, Brown K L, Mookhejee N, 2006. Host defence peptides from invertebrates-emerging antimicrobial strategies. Immunobiology, 211: 315—322
- Lynn D J, Higgs R, Gaines S *et al*, 2004. Bioinformatic discovery and initial characterisation of nine novel antimicrobial peptide genes in the chicken. Immunogenetics, 56: 170—177
- Sarmasik A, Warr G, Chen T, 2003. Production of transgenic medaka with increased resistance to bacterial pathogens. Marine Biotechnology, 5: 300—308
- Savan R, Masahiro Sakai, 2002. Analysis of expressed sequence tags (EST) obtained from common carp, *Cyprinus carpio* L., head kidney cells after stimulation by two mitogens, lipopolysaccharide and concanavalin-A. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 131: 71—82
- Susan E Douglas, Leah C Knickle, Jennifer Kimball *et al*, 2007. Comprehensive EST analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a commercially relevant aquaculture species. BMC Genomics, 8: 144
- Vazquez L, Alpuche J, Maldonado G *et al*, 2009. Review: immunity mechanisms in crustaceans. Innate Immun, 15(3): 179—188

## CONSTRUCTION OF A cDNA LIBRARY FROM LIVER TISSUE OF THE CHINESE SOFTSHELL TURTLE *PELODISCUS SINENSIS*

ZHANG Hai-Qi<sup>1,2</sup>, HE Zhong-Yang<sup>2</sup>, SHAO Jian-Zhong<sup>1</sup>,  
QIAN Guo-Ying<sup>3</sup>, ZHANG Chao<sup>2</sup>

(1. College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, 310058; 2. Zhejiang Fisheries Extension Station, Hangzhou, 310012; 3. Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100)

**Abstract** A high quality cDNA library from the liver of Chinese softshell turtle *Pelodiscus sinensis* was constructed by Superscript cDNA recombinant technique, and expressed sequence tags (ESTs) were analyzed by Gene Ontology method. The results indicate that the titre of the constructed library was  $2.982 \times 10^6$  CFU/ml, the percentage of recombination was 93%, and the average length of inserted cDNA fragment was about 1kb. 4146 raw sequences of the ESTs were obtained, 1957 unigenes including 404 contigs and 1553 singletons were found. 264 cDNA sequences showed similarity to known breeding-relevant genes, including ubiquitin C variant 2, heat shock protein70, metallothionein, superoxidedismutase, CD9, antibacterial peptides and so on. These results built the foundation for further researches on germplasm resources evaluation, molecular genetics studies and molecular breeding of *P. sinensis*.

**Key words** *Pelodiscus sinensis*, Liver, cDNA library, EST, Antibacterial peptides gene