

厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*)血细胞 cDNA 文库的构建及部分 EST 序列分析*

王日昕^{1,2} 廖智² 刘梅² 鲁涛² 武梅² 何光源¹

(1. 华中科技大学中英 HUST-RRes 基因工程和基因组学联合实验室 生命科学与技术学院 武汉 430074;
2. 浙江海洋学院海洋科学学院 海洋生物资源及分子工程实验室 舟山 316004)

摘要 采用 TRIZOL Reagent 提取厚壳贻贝血细胞总 RNA, 分离纯化 mRNA, 在此基础上以 pCMV sport6 质粒为载体通过 Gateway 技术构建了高质量的厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库, 以期获得厚壳贻贝血细胞的 EST 序列标签以及可能的免疫相关功能基因序列。从文库中随机挑选 28 个克隆进行序列测定及在线 BLAST 分析。结果表明, 在 28 个随机克隆中, 有 4 个克隆为 rRNA 基因, 7 个克隆为未知基因, 推测是新基因, 17 个克隆为功能基因, 包括脱氢酶, 细胞色素氧化酶, 热休克蛋白, 金属结合蛋白, 肌动蛋白等。以上研究结果为筛选厚壳贻贝免疫相关的新基因, 深入研究厚壳贻贝免疫相关因子的分子多样性及免疫机制奠定了基础。

关键词 厚壳贻贝, 血细胞, 免疫因子, cDNA 文库, EST

中图分类号 Q789

贻贝是一种常见的海洋生物, 属于软体动物门、双壳纲、翼形亚纲、贻贝目。贻贝本身缺乏类似于高等脊椎动物那样的特异免疫系统, 其免疫主要依赖于体液免疫系统中的各类免疫因子, 对贻贝体液免疫因子的研究有助于人们了解贻贝的免疫机制, 对抗贻贝在养殖过程中的各种病害威胁。目前已报道的贻贝各类免疫因子包括抗菌肽(McPhee *et al.*, 2005; 洪旭光等, 2004), 水解酶, 氧化酶, 凝集素, 单核因子等, 其中, 贻贝抗菌肽具有抗菌作用强、对真核细胞无损伤以及高效、广谱的杀菌特点, 因而有望成为新型生物抗生素的来源。目前已经从贻贝血清中鉴定了四类抗菌肽家族, 分别为 MGD(包括 MGD-1 和 MGD-2) (Hubert *et al.*, 1996; Mita *et al.*, 2000)、mytilin(包括 mytilin A、B、C、D 和 G1) (Charlet *et al.*, 1996; Guillaume *et al.*, 2000)、myticin(包括 myticin A 和 B) (Mita *et al.*, 1999a)以及 mytimycin (Charlet *et al.*, 1996)。其中 MGD 与 myticin A 主要对革兰氏阳性菌

有强的杀菌活性,对海洋无脊椎动物的病原体如对虾白斑病毒等也有强的抑制作用, 而抗革兰氏阴性菌和真菌的作用较弱(Mita *et al.*, 1999b, 2000); Mytimycin 则具有较强的抗真菌活性(Charlet *et al.*, 1996); mytilin 的同分异构体 mytilin B、mytilin C、mytilin D 对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制活性; mytilin G1 则只对革兰氏阳性菌有抗菌活性(Charlet *et al.*, 1996; Guillaume *et al.*, 2000); mytilin B、D 以及 myticin B 还具有强的抗真菌活性(Guillaume *et al.*, 2000)。

贻贝体内免疫因子丰度低且成分复杂, 为进一步研究带来了很大困难。目前, 系统研究贻贝免疫因子的最有效的方法, 是构建免疫组织器官如血细胞的 cDNA 文库, 然后通过筛库获得有意义的免疫相关基因进行深入的研究。利用这一方法, 不仅有助于了解贻贝各免疫因子如抗菌肽等的基因构成, 也有助于了解贻贝免疫因子的分子多样性的机制, 同时也

* 浙江省科技厅面上科研农业项目, 2008C22026 号; 浙江省教育厅重点项目, 20070430 号; 浙江省科技厅新苗人才计划项目, 2008R40G2110003 号。王日昕, 教授, E-mail: wangrixin1123@126.com

通讯作者: 何光源, 教授, 博导, E-mail: hegy@hust.edu.cn

收稿日期: 2008-04-20, 收修改稿日期: 2008-07-30

可以利用文库筛选新的抗菌肽分子。目前, 针对于紫贻贝 (*Mytilus edulis*), 地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 及加利福尼亚贻贝 (*Mytilus californianus*) 等几种贻贝的血细胞 cDNA 文库已经构建成功并进行了大规模测序, 总计获得超过 6 万条 EST 序列, 为深入研究上述贻贝的免疫因子相关基因奠定了基础。

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 是我国浙江省海域常见的一种具有重要经济意义的贝类, 对其体液免疫因子的研究具有重要的学术意义和应用价值, 但目前尚无厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库构建的报道。作者以 pCMV sport6 质粒为载体, 成功构建了高质量的厚壳贻贝血细胞的 cDNA 标准文库并对文库进行了初步序列分析, 为深入研究厚壳贻贝体液免疫因子及其基因奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 采自浙江舟山海域; 总 RNA 提取试剂盒购自上海捷瑞公司; mRNA 分离试剂盒 (FastTrack[®] 2.0Kit) 购自 Invitrogen 公司; 初级 cDNA 文库构建试剂盒 (SuperScript[™] Plasmid System with Gateway[®] Technology for cDNA Synthesis and Cloning) 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 的分离

成年厚壳贻贝采集后饲养于恒温水族箱 (25 ℃), 饲养 24h 后, 以内含抗凝剂 (Alsever 液) 的注射器收集厚壳贻贝血淋巴, 立即离心 (4 ℃, 800g, 15min), 收集血细胞沉淀部分, 采用 TRIZOL Reagent 提取厚壳贻贝血细胞总 RNA, 并以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 同时测定 OD_{260} 和 OD_{280} 值, 分析所提 RNA 的浓度和纯度。

根据 Invitrogen 公司 FastTrack[®] 2.0Kit 试剂盒操作手册, 通过 poly(T) 纤维素柱进行亲和层析, 从厚壳贻贝血细胞总 RNA 中得 poly A⁺ mRNA。

1.3 cDNA 文库的构建

按照 Invitrogen 公司 SuperScript[™] Plasmid System with Gateway[®] Technology for cDNA Synthesis and Cloning 试剂盒说明书进行。取上述步骤中所提厚壳贻贝的总 mRNA 经紫外分光光度计测定浓度和纯度, 确定模板量, 以 SuperScript[™] II RT 为反转录酶于 37 ℃ 在作用下合成 cDNA 第一链; 然后以第一链为模板, 在 *E. coli* DNA 聚合酶 I、*E. coli* RNase H 和

E. coli DNA 连接酶的作用下进行反应以合成第二链, 所得双链 cDNA 经添加接头, 分离纯化等步骤后与 pCMV sport6 质粒连接, 最后转化 *E. coli* DH10B 保存。

1.4 cDNA 文库的质量鉴定与随机测序

1.4.1 文库滴度 (PFU) 的鉴定 采用倍比稀释计数法鉴定文库滴度 (PFU), 取转化后细菌原液 10 μl 稀释 1000 倍后, 从中取出 10 μl 涂布 LB 平板 (含青霉素), 培养 24h 后计数, 按照如下公式计算: 文库滴度 (PFU) = 平板上的克隆数 / 10 × 1000。

1.4.2 文库重组率及平均插入片段的鉴定 根据 cDNA 文库滴度, 取适量文库原液加到含有 IPTG (50 μg/ml) 和 X-gal (50 μg/ml) 的上层琼脂中, 37 ℃ 培养 8—12h, 通过平板上形成的蓝斑和白斑数目来计算文库的重组率。

随机挑取 32 个阳性克隆进行菌落 PCR 验证, 引物为分别为 M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') 和 M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。反应体系为: ddH₂O 20.7 μl、10 × PCR Buffer 2.5 μl、dNTP (10 mmol/L) 0.5 μl、M13F (20 μmol/L) 0.5 μl、DNA Polymerase (5U/μl) 0.3 μl。反应条件为 94 ℃ 预变性 4min, 随后按 94 ℃ 30s、55 ℃ 30s、72 ℃ 3min、72 ℃ 10min 进行, 共设 30 个循环。PCR 产物经 1% Agarose 电泳鉴定其长度大小, 由此判断插入片段的长度。

1.4.3 部分序列测定及分析 随机挑选 28 个阳性克隆送上海 Invitrogen 公司进行测序, 对大于 750bp 的克隆采用 SP6 引物和 T7 引物进行双向测序, 其余为单向测序。获得的序列数据经 lasergen 7.0 软件中的 Editseq 模块进行分析, 进行载体序列去除, 序列拼接以及 ORF 分析后进行在线 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 搜索。

2 结果

2.1 厚壳贻贝血细胞总 RNA 的提取和总 mRNA 的纯化

采用 TRIZOL Reagent 提取获得厚壳贻贝血细胞总 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), 明显可见 28s RNA、18s RNA 和 5sRNA 三条带, 表明 RNA 在提取过程中未被明显降解, 符合 cDNA 文库构建要求。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。

2.2 厚壳贻贝血细胞 cDNA 标准文库的质量鉴定

2.2.1 文库滴度(PFU)的鉴定 取转化后细菌原液 10 μ l 稀释 1000 倍后, 从中取出 10 μ l 涂布 LB 平板(含青霉素), 培养 24h 后平板上的克隆数为 35 个, 通过计算可知文库滴度为 $35/0.01 \times 1000 = 3.5 \times 10^6$ pfu/ml。

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, 得出平均插入片段为 1.3kb(图 2), 经蓝白筛选计算出文库重组率为 98%。

2.3 部分 ESTs 克隆的测序及结果

根据 cDNA 文库筛选结果, 随机挑选 28 个阳性克隆由上海 invitrogen 公司测序。测序结果经去除载体序列及序列拼接, 将基因序列以及由该序列所获得的最长 ORF 翻译成蛋白质的氨基酸序列分别进行 Blast 分析, 序列分析结果见表 1。在所测的 28 个序列中, 有 4 个序列未发现开放阅读框(表 1 中 B02、F07、F11 和 G08), BLAST 分析表明该 4 个克隆为 16s RNA 基因; 7 个克隆(表 1 中 B03、B09、B12、F08、F10、H02 和 H12)未搜索到任何同源基因或蛋白; 另外 17 个克隆均能搜索到同源基因或蛋白, 且多数为其他种类贻贝中已知的基因或蛋白。以上克隆序列均已提交至 NCBI 的 dbEST 数据库, Genebank 编号从 GO898248 到 GO898295。目前, 针对厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库的大规模的测序正在进行中, 测序结果分析将另文报道。

3 讨论

贻贝体内的天然体液免疫因子含量极低, 不便于开展深入研究, 因此, 采取构建 cDNA 文库并进行

筛选以获得相关基因, 在此基础上进行重组表达以获得大量相关重组蛋白进行深入研究。利用 Invitrogen 公司的 Gateway 技术构建 cDNA 文库, 不仅具有较高的克隆率并保证克隆的方向性和精确性, 同时也可以方便的将目标基因定向地重组到任何 Gateway 化的表达载体上以开展表达研究(Karimi *et al*, 2002), 是一种较好的构建 cDNA 文库的方法。作者以 pCMV-sport6 质粒为载体, 利用 Gateway 技术构建的厚壳贻贝血细胞标准 cDNA 文库, 其平均插入片段为 1.3kb, 重组率达 98%, 文库滴度达 3.5×10^6 pfu/ml, 是一个高质量的 cDNA 文库, 为厚壳贻贝体液免疫因子的后续研究奠定了基础。

对本文库随机挑选的 28 个阳性克隆的测序表明, 其中 4 个克隆为 rRNA 基因, 含量较高, 这与组织中 rRNA 基因含量较高的特点相符; 有 7 个克隆为未知基因, 在 GenBank 数据库以及蛋白质数据库中均未能搜索到有效结果, 推测是新基因, 其全基因序列, 表达特征和功能还有待进一步确定; 有 17 个克隆经 BLAST 分析可以搜索到高可信度的结果, 为功能基因, 包括脱氢酶、细胞色素氧化酶、热休克蛋白、金属结合蛋白、肌动蛋白等(表 1)。其中, 热休克蛋白在贝类中与应激反应密切相关, 例如, 当温度达到 40 时, 可诱导地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、菲律宾缀锦蛤(*Tapes philippinarum*)和毛蚶(*Scapharca inaequivalvis*)过表达 HSP70(Piano *et al*, 2004), 而 Cellura 等(2007)的研究表明, 在经细菌诱导后, 地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)体内的抗菌肽基因和热休克蛋白 70 的表达量同步上调, 因此, 热休克蛋白在贝类中是一种重要的体液免疫因子, 与机体

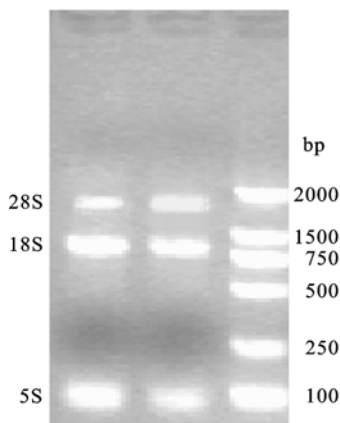


图 1 厚壳贻贝血细胞总 RNA 电泳分析

Fig.1 Analysis of total RNA of haemolymph from *M. coruscus*

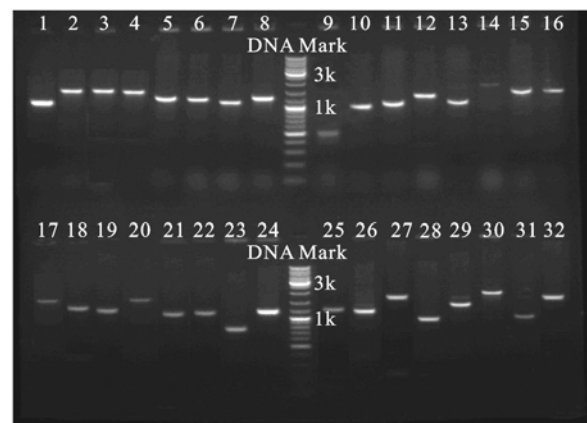


图 2 cDNA 文库插入片段电泳检测图谱

Fig.2 Agarose gel electrophoresis for inserted DNA fragments from the cDNA library

表 1 厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库部分序列在线 BLAST 结果
Tab.1 The BLAST results of some sequences from cDNA

| 克隆编号 | 长度(bp) | 数据库编号 | 功能 | 物种来源 |
|------|--------|----------------|---|-----------------------------------|
| B01 | 548 | gi 6048558 | dehydrogenase subunit 2 | <i>Mytilus californianus</i> |
| B02 | 740 | gb AY515227.1 | 16S ribosomal RNA genes | <i>Mytilus californianus</i> |
| B03 | 973 | — | — | — |
| B08 | 1716 | gi 219428151 | hypothetical protein BRAFLDRAFT_120668 | <i>Branchiostoma floridae</i> |
| B09 | 1042 | — | — | — |
| B10 | 986 | gb AY484747.1 | cytochrome c oxidase subunit II | <i>Mytilus edulis</i> |
| B11 | 867 | gb DQ403129.1 | citrate synthase | <i>Lepus europaeus</i> |
| B12 | 976 | — | — | — |
| D01 | 961 | gi 224471526 | P450 3A1 | <i>Mytilus edulis</i> |
| D02 | 1149 | gi 2832785 | acetylchol-inesterase | <i>Boophilus microplus</i> |
| D08 | 759 | gb EU234531.1 | beta-actin | <i>Crassostrea ariakensis</i> |
| D10 | 762 | gi 74474939 | trefoil factor | <i>Polyandrocarpa misakiensis</i> |
| D11 | 1244 | gi 195157178 | GL12416 | <i>Drosophila persimilis</i> |
| D12 | 415 | emb AJ585375.1 | hsp70-1 gene | <i>Mytilus galloprovincialis</i> |
| F01 | 968 | gb AY515227.1 | 16S ribosomal RNA genes | <i>Mytilus californianus</i> |
| F02 | 1389 | dbj AB162021.1 | elongation factor 1 alpha | <i>Mytilus galloprovincialis</i> |
| F08 | 461 | — | — | — |
| F09 | 1016 | gi 205362524 | heat shock protein 90 | <i>Mytilus galloprovincialis</i> |
| F10 | 848 | — | — | — |
| F11 | 1193 | gi 46360513 | 16S ribosomal RNA genes | <i>Mytilus californianus</i> |
| F12 | 562 | gi 22758890 | ribosomal protein L21 | <i>Argopecten irradians</i> |
| G08 | 465 | gb AY515227.1 | 16S ribosomal RNA genes | <i>Mytilus californianus</i> |
| H02 | 758 | — | — | — |
| H09 | 1000 | gi 38635428 | heavy metal binding protein | <i>Mytilus edulis</i> |
| H10 | 1104 | gi 183223997 | twitchin gene | <i>Mytilus galloprovincialis</i> |
| H11 | 1167 | emb AJ308548.1 | eg gene for endo-1,4-beta-D- glucanase | <i>Mytilus edulis</i> |
| H12 | 590 | — | — | — |

注: 表中“—”代表无结果。以上克隆序列均已提交至 NCBI 的 dbEST 数据库, Genebank 编号从 GO898248 到 GO898295

免疫反应有关;此外,金属结合蛋白也是贝类的一种重要的免疫相关因子,例如,Robert 等(1996)发现,美洲牡蛎体内的金属结合蛋白可调节体内金属离子的浓度,从而抑制病原微生物在体内的生长。

尽管本次所测 EST 序列较少,未能发现厚壳贻贝抗菌肽相关基因,但通过构建高质量的厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库并经初步的测序分析,作者发现了部分与免疫相关的基因,如热休克蛋白、金属结合蛋白等。进一步的大规模测序正在进行中,将有望从厚壳贻贝血细胞 cDNA 文库中发现更多的、有价值免疫相关基因开展后续研究,同时也为将来深入研究厚壳贻贝免疫相关因子的分子多样性基础以及相关的免疫机制奠定基础。

参 考 文 献

- 洪旭光, 孙修勤, 张进兴等, 2004. 海洋抗菌肽研究进展. 高技术通讯, 2: 105—110
- Cellura C, Toubiana M, Parrinello N *et al*, 2007. Specific expression of antimicrobial peptide and HSP70 genes in response to heat-shock and several bacterial challenges in mussels. *Fish Shellfish Immunol*, 22(4): 340—350
- Charlet M, Chernysh S, Philippe H *et al*, 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*. *J Biol Chem*, 271: 21808—21813
- Hubert F, Noel T, Roch P, 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur J Biochem*, 240: 302—306
- Karimi M, Inzé D, Depicker A, 2002. GATEWAY vectors for

- Agrobacterium-mediated plant transformation. Trends Plant Sci, 7(5):193—195
- Mcphee J B, Hancock R E W, 2005. Function and therapeutic potential of host defence peptides. J Peptide Sci, 11: 677—687
- Mitta G, Hubert F, Dyrzynda E A *et al*, 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. Dev Comp Immunol, 24(4): 381—393
- Mitta G, Hubert F, Noëël T *et al*, 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from hemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Eur J Biochem, 265: 71—78
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F *et al*, 1999b. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. J Cell Sci, 112(23): 4233—4242
- Mitta G, Vandenbulcke F, Hubert F *et al*, 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. J Biol Chem, 275(17): 12954—12962
- Piano A, Valbonesi P, Fabbri E, 2004. Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. Cell Stress Chaperones, 9(2): 134—142
- Robert S Anderson, 1996. Interactions of *Perkinsus marinus* with humoral factors and hemocytes of *Crassostrea virginica*. J Shellfish Res, 15(1): 127—134

CONSTRUCTION OF HAEMOLYMPHE cDNA LIBRARY OF *MYTILUS CORUSCUS* AND SCREENING OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS

WANG Ri-Xin^{1,2}, LIAO Zhi², LIU Mei², LU Tao², WU Mei², HE Guang-Yuan¹

(1. China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology (HUST), Wuhan, 430074; 2. Laboratory of Marine Biology Resources and Molecular Engineering, Ocean Science College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

Abstract As one of major artificial breeding marine mollusks in South China, *Mytilus coruscus* is an economically important species, and its antimicrobial defense has been an attractive issue to researchers. The Immunity of *M. coruscus* is related to various immune molecules in plasma, of which antimicrobial peptide is a strong defensin against invasive or non-invasive bacteria, and is intact to eukaryotic cells, which makes the peptide a candidate molecular for developing new biological antibiotics. To obtain the expressed sequence tags (ESTs) and full-length sequences of potential functional-genes, the total RNA of *M. coruscus* hemocytes was extracted with Trizol reagent, and purified in chromatography with oigo (dT) cellulose. In gateway technology, a high-quality cDNA library of *M. coruscus* haemolymph was constructed with pCMV sport6 as the vector. A number of clones were randomly-selected, sequenced, and online-analyzed with BLAST. The result show that among the 28 random clones, four were characterized as rRNA genes, seven were unknown genes (presumably novel ones), and 17 were functional genes (coded for proteins including dehydrogenases, cytochrome oxidases, heat shock proteins, metal-binding proteins and actins etc.); some of them are immunity-related. The construction of high-quality cDNA library of the haemolymph provided a tool to screen out more immunity-related functional genes and to probe molecular diversity of immunity-related factors and the immunologic mechanism.

Key words *Mytilus coruscus*, Haemolymph, Immune factor, cDNA library, EST