

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)cDNA 文库的构建 及肌动蛋白基因的研究*

秦玉明¹ 苏秀榕¹ 李 晔¹ 马 斌¹ 李 惠¹
王孟前¹ 贺静静¹ 李太武^{1,2}

(1. 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

摘要 采用 SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)技术构建缢蛏 cDNA 基因文库。并对 cDNA 文库的滴度, 重组率和插入片段的大小进行了检测。结果表明, 该 cDNA 文库的滴度为 5.50×10^4 cfu/ml, 重组率为 92.5%, 插入片段的长度大多在 1kb 以上。对 478 个克隆子进行了测序, 共得到 430 个有效序列, 其中 166 个序列无同源性, 264 条序列具有同源性。从中得到肌动蛋白(actin)cDNA 的全长 1538bp, 开放阅读框(ORF)为 1131bp, 编码 376 个氨基酸, 其预测蛋白的分子量为 41.78kD, 等电点为 5.30。该氨基酸序列与其它物种的同源性大都在 90%以上。

关键词 缢蛏, cDNA 文库, 序列分析, 肌动蛋白基因

中图分类号 S968.3

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)俗称蛏子、蜻、海蛏, 属软体动物门(Mollusca), 瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroida)、竹蛏科(Solcnidae)、缢蛏属(*Sinonovacula*)。缢蛏分布于西太平洋沿海的中国和日本, 在我国从辽宁到广东沿海均有分布, 被称为四大养殖贝类之一, 是当今贝、虾、鱼、藻综合生态系养殖中的重要成员(王如才等, 1997)。缢蛏营养丰富, 味道鲜美, 是高蛋白、低脂肪、低热量的海洋健康食品之一。此外, 缢蛏还具有很高的药用价值, “其肉性寒, 味甘咸, 能补阴, 去邪热, 治烦闷、冷痢、热痢、妇人产后虚损等症; 其壳入药, 有解毒消炎之功效, 主治咽喉肿痛”(张庭广等, 1998)等。

目前对于缢蛏的研究主要集中在生态习性(范德鹏等, 2002; 吴天明等, 1987)、营养成分(罗蔚华等, 2006; 安贤惠, 2005; 林叶等, 2006)、养殖技术(刘瑞义, 2006; 苏仰源, 2006)、遗传结构与生化遗传特征分析(李成华等, 2004; 王冬群等, 2005; 李太武等, 2003)等方面。在 Genbank 中公布的关于缢蛏的基因仅有

164 条, 其中绝大多数是微卫星序列, 线粒体 RNA 和核糖体 RNA, 已公布的功能基因只有细胞色素氧化酶亚基 I 的部分序列, 可见目前对于缢蛏功能基因的研究很少, 构建缢蛏 cDNA 文库, 进行序列分析对研究缢蛏功能基因的克隆与表达具有重要意义。

肌动蛋白是真核细胞中基因序列最保守, 含量最丰富的蛋白质之一, 在生物体内能够稳定表达(朱芷葳等, 2006)。作为细胞骨架和结构的主成分, 肌动蛋白执行着重要的生理功能, 如参与细胞分裂, 细胞运动, 胞内物质运输以及细胞内信号传导, 细胞与细胞间的相互作用等(程超等, 2007; Qualmann *et al*, 2009)。本文报道对缢蛏 cDNA 文库的构建及肌动蛋白基因的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用缢蛏(*Sinonovacula constricta*)采自浙江省宁波市市长街镇。总 RNA 提取采用 Invitrogen 公

* 国家高技术研究发展计划(863 计划), 2006AA10A410 号; 长江学者和创新团队发展计划, 2007—2009; 宁波市科技局资助项目, 2006C100041 号; 宁波市海洋渔业局资助项目, 2006—2008。秦玉明, 硕士研究生, E-mail: qinyum99@163.com

通讯作者: 苏秀榕, 教授, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-27, 收修改稿日期: 2009-02-21

司生产的 TRIzol 试剂; mRNA 纯化使用 Promega 公司的 mRNA Isolation system IV 试剂盒; 全长 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

取缙蛭的斧足, 按 TRIzol 说明书提取总 RNA。纯化 mRNA 后, 电泳检测 RNA 抽提和纯化结果。

1.2.2 cDNA 的合成及文库的构建

取纯化后 mRNA 约 1.50 μ g, 参照 cDNA 文库构建试剂盒说明书合成双链 cDNA, 电泳检测 cDNA 的质量。在 10 μ l 体系中, 将 cDNA 定向连到 pDNR-LIB 载体上, 克隆位点是位于 5'端的 Sfi IA; 3'端的 Sfi IB。体系为: 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 连接过夜。将连接产物电转化至大肠杆菌 DH10B, 电转化条件为: 1.5kV、200 μ s、25 μ F, 得到初始文库。取一部分转化产物涂板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后用质粒抽提试剂盒抽提质粒, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.3 文库的库容及滴度检测

取 1 μ l 上述原始文库, 用 LB 培养基进行 10⁻²、10⁻⁴ 和 10⁻⁶ 稀释后, 涂布于含 30 μ g/ml 氯霉素的 LB 平板上, 检测文库库容和滴度测定。随机挑选 40 个菌落于灭菌水中, 沸水浴 10 min 变性后, 用试剂盒中的 M13 引物进行 PCR 扩增, 检测插入 DNA 的片段长度和重组率, 电泳检测扩增产物。

1.2.4 序列测定与分析

将原始文库用 LB 培养基进行 10⁻²、10⁻⁴ 和 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 478 个菌落进行测序, 测序结果在 NCBI 上进行序列同源性比较。

2 结果

2.1 总 RNA 和 mRNA 质量检测

提取的 RNA 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1, 结果显示: 总 RNA 三条主带为 28S, 18S 和 5.8S,

条带特异性较好, 中间没有杂带, 分离纯化后的 mRNA 含量也较高, 说明总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化效果都较好。

2.2 cDNA 的检测

双链 cDNA 凝胶电泳结果见图 2, 结果显示, 双链 cDNA 呈弥散状分布, 且主要集中在 1.0—1.5kb 长度附近, 用胶回收去除 500bp 以下的短片段后, 可见片段大多在 1kb 以上。

2.3 cDNA 质量的鉴定

文库的滴度约为 5.50 \times 10⁴ cfu/ml, 用菌落 PCR 方式鉴定文库重组率为 92.5%, 且插入的片段绝大部分在 1kb 以上(图 3)。

2.4 测序结果初步分析

对 478 个克隆子进行了测序, 去除低质量序列和载体序列后, 获得长度大于 500bp 的序列共有 430 条,

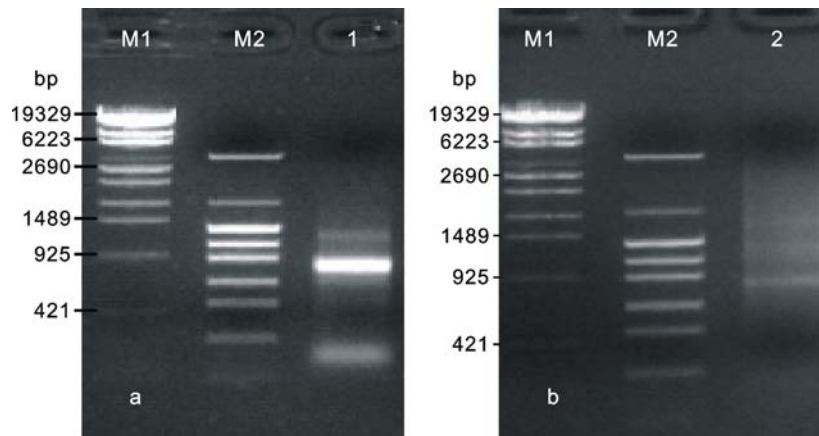


图 1 RNA 电泳图

Fig.1 Electrophoresis of total RNA and mRNA
M1: λ -EcoT14, M2: pHY, 1: 总 RNA, 2: mRNA

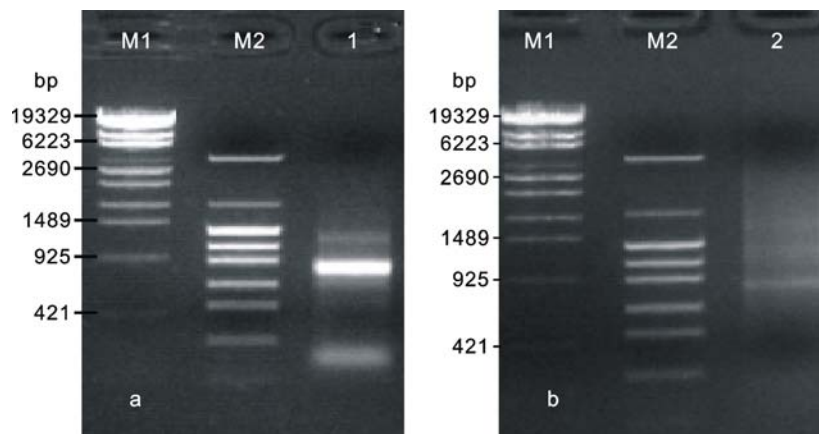


图 2 双链 cDNA 电泳图

Fig.2 Electrophoresis of double-stranded cDNA
M1: λ -EcoT14, M2: pHY, 1: 合成的双链 cDNA, 2: 去除短片段的双链 cDNA

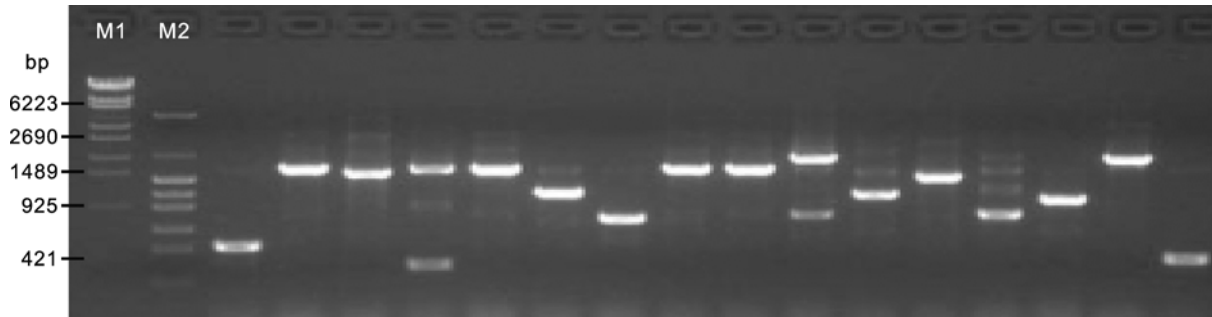


图3 cDNA文库的插入片段大小的鉴定

Fig.3 Characterization of the inserted fragment size of cDNA library
M1: λ -EcoT14, M2: pHY

通过 BLAST 软件比对分析, 结果显示: 264 个序列有同源性, 166 个序列无同源性, 其中同源性较好的基因共有 54 种。

2.5 肌动蛋白基因的序列分析

肌动蛋白基因全长 1538bp, 包括 68bp 的 5'非编码区(5'-UTR), 1131bp 的开放阅读框(ORF), 339bp 的 3'非编码区(3'-UTR)。其中开放阅读框编码 376 个氨基酸, 3'非编码区含有一个 28bp 腺苷酸的 poly(A)尾部, 其预测蛋白的分子量约为 41.78kDa, 等电点为 5.30。通过 NCBI BLAST 可以找到肌动蛋白有三个结构域: ATP 结合位点, 由 6 个氨基酸残基组成(Ser-15, Asp-155, His-162, Glu-215, Gly-303, Lys-337); 凝胶原蛋白结合位点由 9 个氨基酸残基组成(Tyr-144, Gly-147, Glu-168, Gly-343, Ile-346, Leu-347, Leu-350, Ser-351, Thr-352); 泛变应原肌动蛋白抑制蛋白结合位点, 由 11 个氨基酸残基组成(Tyr-167, Glu-168, Tyr-170, Leu-172, His-174, Asp-287, Asp-289, Thr-352, Glu-362, Arg-373, Lys-374) (图 4)。将所得到的 actin 序列在 NCBI 上进行同源性比较, 该序列与其它物种的 actin 序列同源性很高, 都保持在 90%以上, 表明 actin 在生物进化过程中具有高度的保守性。其中与日本血吸虫 *Schistosoma japonicum* (AAF34686)、皱纹盘鲍 *Haliotis discus hannai* (AAQ92368)、合浦珠母贝 *Pinctada fucata* (ACD99707)、太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (AAB81845)、黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* (ABW05044)、大鼠 *Rattus norvegicus* (CAA24529) 的同源性分别为 96%、98%、95%、97%、93% (图 5)。

3 讨论

3.1 cDNA 文库

自 20 世纪 70 年代首例 cDNA 克隆问世以来, cDNA 文库构建方法就在不断的提高和改进(杨成君

等, 2007)。目前 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。由于 cDNA 便于克隆和大量表达, 不像基因组 DNA 含有内含子而难于表达, 因此, 可以通过各种合适的方法从文库中调取需要的 cDNA, 为研究生物基因的结构和功能及获取目的基因进行基因工程操作带来极大的便利 (Andreia *et al.*, 2007; DU *et al.*, 2007; 孙朝晖等, 2005)。目前构建 cDNA 文库已广泛应用于研究不同发育阶段基因表达的变化, 克隆新型细胞因子, 分离组织特异基因, 提供分子标记连锁图谱的所用探针, 保护濒危生物资源等等。

本研究采用 SMART 技术构建了缢蛭全长 cDNA 文库, 挑菌测序后获得了缢蛭一系列基因序列。其中与免疫相关的基因对于缢蛭良种选育研究以及抗性研究具有极为重要的意义。目前国内外对于贝类基因和贝类免疫的研究尚处于比较落后的状态, 对缢蛭相关抗性基因序列的获得与研究, 有助于进一步了解缢蛭在不同应激条件下相关蛋白的表达, 对于邻近物种的研究也有帮助, 从而促进了贝类学的发展。

3.2 序列分析

目前国内外对缢蛭分子生物学方面的研究很少。对于其它贝类及缢蛭邻近物种基因方面的研究也较少, 所研究的基因只有一些管家基因和较为基本的抗性基因, 如肌动蛋白(actin)、16s 核糖体 RNA、热休克蛋白 70(HSP70)、热休克蛋白 90(HSP90)、Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 等。这给缢蛭基因序列的比对带来了一系列的困难。本实验在缢蛭 cDNA 文库挑菌测序的结果中, 经分析共获得同源性较好的 54 种基因序列, 且部分是编码氨基酸的全长序列。其中绝大

```

1   TTTGTTAAGCCGCAAAAGTTGCTCGGAATCTACGTCTACGTTCTCTCAGAACCTAACAGATCAACATGTGTGAC
      # M C D
76  GACGAAGTTGCCGCTCTTGTGCGTGGACAATGGTTTCAGGAATGTGCAAAGCCGGCTTCGCCGGAGACGACGCTCCC
      D E V A A L V V D N G [S] G M C K A G F A G D D A P
151 AGAGCCGTCTCCCGTCCATCGTCGGTCGCCCCAGACATCAGGGTGTGATGGTGGGTATGGGACAGAAGGACAGC
      R A V F P S I V G R P R H Q G V M V G M G Q K D S
226 TACGTCGGAGATGAAGCCAGCAAGAGAGGTATCTCACCTGAAGTACCCATTGAGCACGGCATCGTCACC
      Y V G D E A Q S K R G I L T L K Y P I E H G I V T
301 AACTGGGACGATCTGGAGAAGATCTGGCACCACACCTTCTACAACGAGCTGCGTGTGCCCCAGAGGAACACCCA
      N W D D L E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P
376 GTCCTGCTACTGAGGCTCTCTTAACCCCAAGGCCAACAGGAAAAGATGACCCAGATCATGTTTCGAGACCTTC
      V L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F
451 AACTGCCCGCATGTATGTGGCCATCCAGGCTGTATTGTCCTGTACGCTTCGGTTCGTACCACCGGTATCGTG
      N C P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T G I V
526 CTCGACTCCGGCGATGGTGTACCCACACCGTGCCATCTACGAGGGTTACGCTCTGCCCCAGCCATCTCCGT
      L [D] S G D G V T [H] T V P I [Y] [E] [G] [Y] A [L] [P] [H] A I L R
601 CTTGACTTGGCCGCGAGAGATCTTACCGACTACTTGATGAAGATCTCTACTGAGCGTGGTACTCATTACCACC
      L D L A G R D L T D Y L M K I L T E R G Y S F T T
676 ACCGCTGAGCGTGAGATTGTGAGAGACATCAAGGAGAAGCTGTGCTACGCTCGCTCTGGACTTCGAGCAGGAGATG
      T A E R E I V R D I K [E] K L C Y V A L D F E Q E M
751 GCCACCGCCGCTCTCTCTCTCTCTGGAGAAGAGTACGAGCTTCCCGACGGTCAGGTGATTACCGTCGGCAAC
      A T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I T V G N
826 GAGCGATTCCGTTGCCCGAGTCTCTGTTCCAGCCATCCTCTCTGGGTATGGAATCTGCTGGTATCCATGAGACC
      E R F R C P E S L F Q P S F L G M E S A G I H E T
901 ACATAACAACAGCATCATGAAGTGCACGTCGACATCCGTAAGGATCTGTACGCCAACACTGTCCTGTCCGGTGGC
      T Y N S I M K C [D] V [D] I R K D L Y A N T V L S G [G]
976 ACCACCATGTTCCCGGTATTGCCGACAGAATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCTCCATCCACCATGAAGATC
      T T M F P G I A D R M Q K E I T A L A P S T M K I
1051 AAGATCATCGCTCTCCAGAGCGCAAATACTCCGCTCGGATCGGTGGTCCATCCTGGCCTCTCTGTCCACCTTC
      K I I A P P E R [K] Y S V W I G G S I L A S L S [T] F
1126 CAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGCCATCCATTGTCCACAGAAATGCTTCAAGTT
      Q Q M W I S K Q [E] Y D E S G P S I V H [R] [K] C F #
1201 AAGAGCGCTCAAGAACATTCTGAAGAGCCAAATCCAAACGTTTCGTCCTTTTTAAAAATACAAAGTGATATT
1276 TTTTCAAACAGTCTACCTCGATTATTTTTCAAATATTTATTAAGAGAGACACACTACTGAAGGCAGCTAA
1351 GAAGTGAACACTTGTTCGACAAACAGAGTCACTAGACGTCGCGCGTGCATTGTGATTGCTCTGGGTTAAGCT
1426 CAAAGGCAGTAACCTTTGTCTTGTCTTGGGTTGGTTCCTGTTTCATGCCGATTGAGAGATGTATTAACATG
1501 GTAAATTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4 缙蛭 actin 全长序列和编码的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotide sequence of the cDNA encoding actin from *S. constricta* and its deduced aminoacid sequence

注: “#”表示起始密码子和终止密码子, “□”表示 ATP 结合位点, 下划线表示凝胶原蛋白结合位点, “ ”表示泛变应原肌动蛋白抑制蛋白结合位点

多数基因与营养代谢、生理学过程、酶活性、细胞过程及转录调节过程有关, 如铁结合蛋白(ferritin)、肌动蛋白(actin)、肌球蛋白轻链(myosin essential light chain)、原肌球蛋白(tropomyosin)、精氨酸激酶(arginine kinase)、磷酸甘油酸激酶变位酶(phosphoglycerate mutase)、核糖体蛋白(ribosomal protein)、糖基水解酶(probably secreted glycosyl hydrolase), 肌氨酸脱氢酶(sarcosine dehydrogenase), 甘油-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)等。少数和信号转导以及细胞分裂分化等功能有关, 如钙调蛋白(calponin-like protein), 硫转运蛋白(sulphate transporter), 硒结合蛋白(selenium binding protein), 等。还有 166 条序列无法通过序列比对确定基因型, 有待于利用其它方法作进一步的研究。

3.3 肌动蛋白

肌动蛋白是真核生物中广泛存在的一种蛋白质, 是微丝的结构成分, 其单体外观呈哑铃状。肌动蛋白与原肌球蛋白, 肌钙蛋白组成细丝, 细丝与由肌球蛋白组成的粗丝有规律的交替排列组成肌原纤维。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高到一定程度时, 肌动蛋白与肌球蛋白相互作用, 产生肌动球蛋白, 催化 ATP 水解产生的能量使细丝沿粗丝滑动, 即为肌肉收缩(罗军, 1989; 章梁等, 2008)。在体内, 肌动蛋白还能够通过与不同类型的肌动蛋白结合蛋白(ABPs)相互作用, 装配形成各种高度有序的超分子结构, 以行使不同的细胞功能。如构成细胞支架, 维持细胞形状, 与细胞运动及细胞内细胞质的运动密切相关, 参与细胞内信号传递, 参与蛋白质的合成(贺涛才, 2002)。此外, 肌动

	<u>MCDDE-VAALVVDNNGSGMCKAGFAGDDAPRAVFPISIVGRPRHQVVMGMGQKDSYVGVDEAQSQRGILTLK</u>	70
<i>Sin</i>	... D. -	69
<i>Sch</i>	. A. . . Q.	69
<i>Hal</i>	... D- . . . I.	69
<i>Pin</i>	... D. -	69
<i>Cra</i>	. G. . D-I.	69
<i>PeI</i>	. - . D. -I.	68
<i>Rat</i>	... DETT. . . C. . . LV.	70
	<u>YPIEHGIVTNWDDMEKEWHHTFYNELRVAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNSPAMYVAIQ</u>	140
<i>Sin</i> L. C.	139
<i>Sch</i> T. . . . G.	139
<i>Hal</i> Q.	139
<i>Pin</i> A.	139
<i>Cra</i>	139
<i>PeI</i> T.	138
<i>Rat</i> I. . . . T. . . . V.	140
	<u>VLSLYASGRITGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFTTAEI</u>	210
<i>Sin</i>	209
<i>Sch</i>	209
<i>Hal</i> M.	209
<i>Pin</i>	209
<i>Cra</i> S. . . . M.	209
<i>PeI</i> M.	208
<i>Rat</i> N. . . . M.	210
	<u>VRDIKEKLCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESAGIHETT</u>	280
<i>Sin</i> V. . . . S.	279
<i>Sch</i> V.	279
<i>Hal</i> D.	279
<i>Pin</i> A. . M.	279
<i>Cra</i> T. . . . M. . . . S. . . . S	279
<i>PeI</i> G. . . . C.	278
<i>Rat</i> N. . . . T. . . . I.	280
	<u>YNSIMKCDVDIRKDLYANTVLSGGTTFMFGIADRMQKEITALAPSTMKIKIAPPKYSVWIGGSILAS</u>	350
<i>Sin</i>	349
<i>Sch</i>	F. . . . V.	349
<i>Hal</i> Y. . . . V.	349
<i>Pin</i> S.	349
<i>Cra</i> I. . . . V. . . . P. . . . V.	349
<i>PeI</i>	F. . . . Y. . . . S.	348
<i>Rat</i> I. . . . N. M. . . . Y.	350
	<u>LSTFQQMWISKQEYDESGPSIVHRKCF</u>	377
<i>Sin</i>	376
<i>Sch</i> G.	376
<i>Hal</i>	376
<i>Pin</i>	376
<i>Cra</i>	376
<i>PeI</i>	375
<i>Rat</i> T. . . . A.	377

图 5 缙蛭 actin 序列与其它物种间的同源性分析

Fig.5 Alignment of *S. constricta* actin polypeptide sequence with other orthologues

蛋白可以与细胞间粘附连接,紧密连接相互作用,调节微血管内液体及各种大分子物质外渗屏障功能(唐诗彬,2002)。

近来大量的文献报道肌动蛋白存在于细胞核内。Theodore 等(1979)的研究表明,肌动蛋白存在于细胞核内,与核基质紧密结合。有研究发现 α -肌动蛋白存在于细胞核和灯刷染色体中,并作为染色质重构复合物的一个必须亚基参与了转录过程(王洪振等,2005)。还有研究发现在大鼠精子发生过程中, α -肌

动蛋白在 A 型精原细胞中表达量较高,推测可能是因为 α -肌动蛋白参与了精原细胞有丝分裂的某些过程(成毅明等,2005)。

研究表明,肉质与肌原纤维的粗细和肌节的长短有密切关系。肌原纤维越细越密,肉质越嫩,肌原纤维越粗越疏,肉质越差;肌节越长肉质越嫩,肌节越短肉质越差。肌动蛋白是肌原纤维的重要组成部分,肌动蛋白的含量直接影响着肉质的好坏。不同产地缙蛭其肉质品质不同,也与其体内肌动蛋白的含量有

着密切的关系(闵连吉, 1991; 章梁等, 2008)。越来越多的研究表明肌动蛋白参与了广泛和复杂的生命活动, 是生物体内必不可少和有重要研究价值的蛋白, 值得对其进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 王冬群, 李太武, 苏秀榕, 2005. 象山缢蛏养殖群体与野生群体遗传多样性的比较. 中国水产科学, 12(2): 138—142
- 王如才, 王如萍, 1997. 海水贝类养殖学. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 72—379
- 王洪振, 程焉平, 2005. 细胞核内肌动蛋白参与基因转录的研究进展. 吉林师范大学学报, 5(2): 34—36
- 成毅明, 石心泉, 于和鸣等, 2005. α -肌动蛋白在大鼠精子发生过程中的特殊表达. 中国男科学杂志, 10(11): 755—760
- 朱芷葳, 董常生, 2006. 持家基因作为相对定量内标物的稳定性比较. 生物技术通讯, 17(5): 807—809
- 刘瑞义, 2006. 池塘高效养殖缢蛏技术. 海水养殖, 2: 34—35
- 安贤惠, 2005. 几种缢蛏的营养性和健康性分析评价. 海洋湖沼通报, 4: 99—103
- 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
- 苏仰源, 2006. 自然海区缢蛏苗种生产技术. 水产科技情报, 33(2): 53—55
- 李太武, 王冬群, 苏秀榕, 2003. 缢蛏生化特征分析. 海洋与湖沼, 34(6): 640—646
- 李成华, 李太武, 宋林生等, 2004. 4 个缢蛏群体遗传结构的 RAPD 分析. 水产科学, 23(12): 26—28
- 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
- 吴天明, 林笔水, 1987. 几种环境因子对缢蛏苗存活率的影响. 台湾海峡, 2: 120—126
- 闵连吉, 1991. 肌原纤维和肉的保水性. 肉类研究, 2: 5—8
- 张庭广, 何存曙, 1998. 缢蛏主要化学成分含量分析. 中国中药杂志, 23(12): 621
- 范德鹏, 潘鲁青, 2002. 温度对缢蛏耗氧率和排氨率的影响. 青岛海洋大学学报, 32(1): 56—62
- 林 叶, 苏秀榕, 2006. 不同种群缢蛏氨基酸与脂肪酸比较研究. 食品科学, 27(12): 675—677
- 罗 军, 1989. 肌肉纤维特性研究进展. 中国牛业科学, 4: 36—40
- 罗蔚华, 钱晓薇, 杨曙光等, 2006. 乐清产缢蛏肉营养成分的研究. 江西科学, 24(5): 360—362
- 贺淹才, 2002. 肌动蛋白和肌动蛋白基因的研究进展. 生命的化学, 22(3): 248—250
- 唐诗彬, 2002. 细胞间连接和肌动蛋白在微血管通透性调节中的作用. 国外医学, 5: 500—502
- 章 梁, 侯温甫, 黄泽元, 2008. 肌原纤维特性及其在鱼肉加工中的应用. 武汉工业大学学报, 27(4): 19—22
- 程 超, 张 军, 朱久进等, 2007. 肌动蛋白的形态分布与细胞粘附性之间的关系. 生物医学工程学杂志, 24(1): 226—229
- Andreia F, Aladje B, Héla C *et al*, 2007. Cost effective method for construction of high quality cDNA libraries. Biomolecular Engineering, (24): 419—421
- DU Li-xin, LIU Shu-fang, ZHU Jin *et al*, 2007. Construction of SMART cDNA library of sheep ovary and identification of candidate gene by homologous cloning. Agricultural Sciences in China, 6(11): 1390—1395
- Qualmann B, Kessels M M, 2009. New players in actin polymerization—WH2-domain-containing actin nucleators. Trends in Cell Biology, 19(6): 276—285
- Theodore G Clark, Joel L, 1979. An actin filament matrix in handisolated nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. Cell, 18: 1101—1108

CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY WITH *SINONOVACULA CONSTRICTA* AND SEQUENCE ANALYSIS OF ACTIN GENE

QIN Yu-Ming¹, SU Xiu-Rong¹, LI Ye¹, MA Bin¹, LI Hui¹,
WANG Meng-Qian¹, HE Jing-Jing¹, LI Tai-Wu^{1,2}

(1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

Abstract SMART (switching mechanism at 5'-end of RNA transcript) technique to construct full-length cDNA library with *Sinonovacula constricta* was adopted and the library titre, recombinant rate, and the length of inserted cDNA were measured. The results indicate that this library' titre reached 5.50×10^4 cfu/ml; the percentage of recombination was as high as 92.5%. The PCR results show that the average size of inserts was larger than 1000bp. 478 clones were sequenced and 430 valid sequences were obtained, in which 264 cDNA sequences showed similarity to known genes. Actin was found by aligning it with those of the homologues in the NCBI database's Blast program. Its full-length was 1538bp, including an open reading frame (ORF) encoding apolyptide of 376 amino acids with predicted molecular weight of 41.78kD and theoretical isoelectric point of 5.30. The amino acids sequence aligned with other species was higher than 90%, meaning actin is a high conserved gene.

Key words *Sinonovacula constricta*, cDNA library, Sequence analysis, Actin gene