

青蛤(*Cyclina sinensis*)cDNA 文库构建 及免疫相关因子基因的筛选*

高玮玮¹ 潘宝平²

(1. 天津市河西区职工大学 天津 300203; 2. 天津师范大学生命科学学院
天津市动植物抗性重点实验室 天津 300387)

提要 在鳃弧菌侵染下, 利用 SMART 方法构建了青蛤的 cDNA 文库, 并采用高通量测序方法和 BLASTX 比对筛选出 ESTs 及免疫相关因子的基因。结果表明, 所构建的 cDNA 文库的库容量为 1.12×10^6 , 插入片段均在 500bp 以上; 大于 100bp 的有效 ESTs 序列 1113 条, 平均长度 725bp, 拼接后获得一致性序列 420 条, 其中包括 126 个叠联群和 294 个单拷贝 EST, BLASTX 比对后获得注释序列 271 条, 进一步筛选获得青蛤免疫相关因子基因序列 45 条, 为克隆其免疫防御相关因子的基因提供了重要的基础。

关键词 青蛤, cDNA 文库, ESTs, 免疫相关因子基因
中图分类号 Q789

青蛤(*Cyclina sinensis* Gmelin 1791)是我国重要的海产增养殖对象, 是科技部“863 计划”重点研究开发的绿色养殖贝类之一。青蛤具有生长快、分布广、耐污染性强、肉质鲜美和经济产出率高等集产业化和商品化的共同优点(王慧珍, 1991; Liu *et al.*, 2002), 在日本、韩国、东南亚等地拥有广阔的销售市场。但随着青蛤养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 在我国江苏等地已有连年病害并造成大面积青蛤死亡报道(曹华, 2004; 孙国铭等, 2004), 产生了严重的经济损失, 因此亟待开展青蛤抗病害与免疫防御机制等方面的研究。

目前有关青蛤的研究主要集中在生长指标及生态环境等方面(于业绍等, 1994; 王慧等, 1994, 2005), 有关病害与免疫机制的研究报道多见于病原微生物的筛选(王兰萍, 2007)、某种免疫相关酶活力及相关因子基因表达等方面的研究(李晓英等, 2009a, b; 宋欣等, 2010; 潘宝平等, 2010; 刘可君等, 2011; 吕达等, 2012), 但有关青蛤免疫相关因子基因的整体分析

报道较少。本研究以鳃弧菌胁迫下的青蛤组织为材料, 建立了青蛤的全长 cDNA 文库, 为进一步揭示青蛤的免疫相关因子的遗传和调控机制奠定了重要基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

试验用青蛤采自天津大港滩涂, 选取形态指标没有显著性差异的成体约 120 枚, 其壳长平均值 (29.32 ± 1.53) mm, 壳高平均值 (29.17 ± 1.64) mm, 壳宽 (18.12 ± 0.42) mm。样品暂养于人工海水中(密度 1.020—1.040, 水温 20—23℃, 盐度 2.8—3.1, pH 7.0), 持续曝气, 每天投喂 5‰ 的小球藻。

1.2 方法

1.2.1 样品制备 将鳃弧菌于 2216E 培养基上 37℃ 培养 24h 后, 用无菌生理盐水重悬菌液, 将其浓度调为至 $OD_{600} = 0.4$ (宋欣等, 2010)。给每只青蛤注射 50μl 鳃弧菌液, 暂养 6h 后在冰上麻醉进行活体解剖, 取出青蛤各组织(肝胰脏、闭壳肌、腹足、外套膜、

* 天津市科委应用基础与前沿技术重点项目资助, 12JCZDJC22800 号, 09JCZDJC19300 号。高玮玮, E-mail: weiwei-gao19840223@163.com

通讯作者: 潘宝平, 博士, 教授, E-mail: panbaoping@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-04-20, 收修改稿日期: 2012-06-15

鳃、生殖腺)样品混合。

1.2.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化 将青蛤组织样品在灭菌的 DEPC 处理水冲洗后放于液氮中研磨, 置于 1ml Trizol (TaKaRa) 中提取组织总 RNA, 采用 Oligotex mRNA Kits 试剂盒(QIAGEN)分离 mRNA, 将所提取的总 RNA 进行变性凝胶电泳及紫外分光光度计检测。

1.2.3 cDNA 合成 以分离得到的青蛤 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链。将 3 μ l mRNA, 1 μ l SMART Oligonucleotide, 1 μ l CDS /3' PCR Primer)混匀并稍离心, 72 $^{\circ}$ C 温浴 2min, 冰浴 2min, 稍离心后加入以下试剂: 2 μ l \times First-Strand Buffer, 1 μ l DTT (20 mmol/L), 1 μ l dNTP Mix (10mmol/L), 1 μ l PowerScript Reverse Transcriptase, 终体积为 10 μ l, 混匀、稍离心, 42 $^{\circ}$ C 温浴 1h, 将离心管置于冰上, 终止反应(Du *et al*, 2007)。

以 cDNA 第一链为模板合成双链 cDNA (LD PCR), 体系为: 2 μ l cDNA 第一链, 80 μ l ddH₂O, 10 μ l 10 \times Advantage 2 PCR Buffer, 2 μ l 50 \times dNTP Mix, 2 μ l 5' PCR Primer, 2 μ l CDS /3' PCR Primer, 2 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix。LD PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 1min; 95 $^{\circ}$ C 15s, 68 $^{\circ}$ C 6min, 26 个循环。PCR 结束后取 5 μ l 样品进行电泳检测。

LD PCR 产物用 2 μ l 蛋白酶 K (20 μ g/ μ l) 在 45 $^{\circ}$ C 温浴 20min 进行消化处理, Sfi 酶液 50 $^{\circ}$ C 孵育 2h, 除去小于 500bp 的 cDNA 片段。

1.2.4 cDNA 文库的构建 将 cDNA 与 pBluescript SK 的改造载体相连, 反应体系为: 1 μ l cDNA, 1 μ l Vector (25ng/ml), 1 μ l 10 \times Ligation Buffer, 1 μ l ATP (10mmol/L), 1 μ l T₄ DNA Ligase, 5.5 μ l Deionized H₂O, 混匀后置于 16 $^{\circ}$ C 恒温水浴中过夜。

取 1 μ l 连接产物加入到 200 μ l 感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 冰浴 45min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热激 90s, 冰上 2min。加入 2ml LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 摇床温育 45min (转速 150r/min)。3000r/min 离心 10min 收集菌体, 250 μ l LB 重悬菌液。取 250 μ l 菌液涂布于 Apr-IPTG/x-gal LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 过夜。统计培养皿上清晰的菌落总数和蓝白菌落数, 计算质粒文库的库容量和重组率。

随机挑取部分单克隆菌落, 使用通用引物 T3 和 T7 进行菌落 PCR 检测, 统计插入片段的大小。

1.3 EST 序列测定及免疫相关因子的筛选

采用 GIANTPREPTM HIGH PURITY PLASMID MAXIPREP KITS 试剂盒(GIANTAGEN)抽提阳性克隆质粒, 利用高通量测序方法进行测序, 选取连续碱基质量大于 Q13 且长度大于 100bp 的区域作为 ESTs

数据, 用 Phrap 软件进行序列拼接, BLASTX 程序将 ESTs 序列与 NCBI 的非冗余蛋白序列数据库进行比较, 对获得注释的功能基因进行筛选(同源性大于 70%, *E* 值小于 10⁻⁵)。

2 结果

2.1 RNA 的提取与纯化

总 RNA 电泳检测到两条单一明亮的条带, 分别为 18S 和 28S。紫外分光光度计检测结果显示, 提取得到青蛤总 RNA 549 μ g, 浓度为 1.309 μ g/ μ l, 其中 OD_{260nm}/OD_{280nm} 为 2.07, 表明 RNA 纯度较高(表 1)。经纯化后得到 mRNA 1.6 μ g, 浓度为 8 μ g/ μ l, OD_{260nm}/OD_{280nm} 为 2.39, 说明 mRNA 质量较高(表 2)。

表 1 总 RNA 的分光光度计检测
Tab.1 Total RNA detection by spectrophotometer

终浓度(μ g/ μ l)	总量(μ g)	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{280nm}
09	549	33.756	16.342	2.07

表 2 mRNA 的分光光度计检测
Tab.2 mRNA detection by spectrophotometer

终浓度(μ g/ μ l)	总量(μ g)	OD _{260nm}	OD _{280nm}	OD _{260nm} /OD _{280nm}
8	1.6	0.201	0.084	2.39

2.2 cDNA 文库的构建

LD-PCR 后进行电泳检测, 双链 cDNA 产物呈弥散条带, 主要富集在 500—2000bp。cDNA 分级分离, 所收集的为 3—7 号管, 所用 marker 为 Gibco/BRL 公司的 1kb DNA ladder, 如图 1 所示, 除去了小于 500bp 的 cDNA 片段, 保证文库中的插入片段在 500bp 以上。

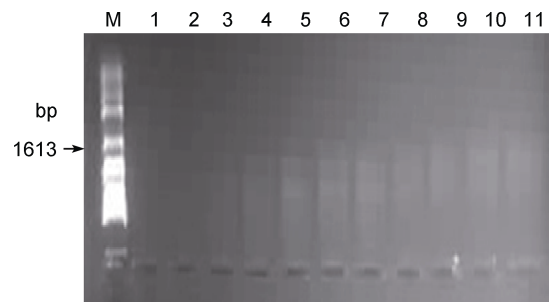


图 1 cDNA 的分级分离电泳

Fig.1 Fractionation of cDNA by electrophoresis

2.3 cDNA 文库质量检测及插入片段的鉴定

将 cDNA 与 pBluescript SK 的改造载体的连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 后, 得到的菌落数为

1120, 其中蓝斑数为 40, 白斑数为 1080。计算得到文库的重组率为 96.4%。库容量 = 菌落数×连接产物量 = 1120×10×100 = 1.12×10⁶。

随机挑取部分克隆进行菌落 PCR 检测, Maker 为 DL2000, 结果显示, 插入片段均在 500bp 以上(图 2), 基本满足本实验后续 ESTs 分析的要求。

2.4 EST 序列分析及免疫相关基因的初步筛选

测序获得 ESTs 序列 1249 条, 其中有效 ESTs 序列(>100bp)1113 条, 平均长度 725bp。拼接比对后获

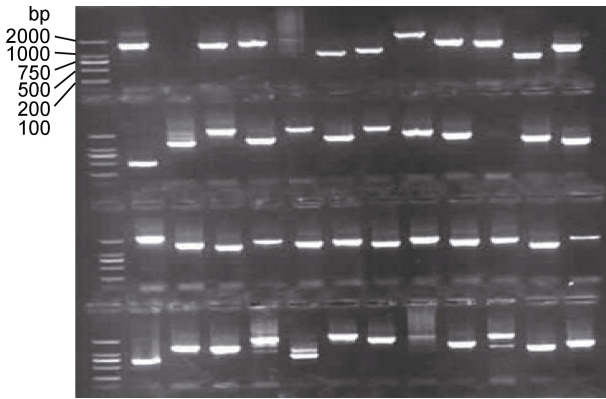


图 2 青蛤的 cDNA 文库插入片段检测
Fig.2 Detection of insert fragments cDNA Library in *C. sinensis*

得 420 条一致性序列(Unigene sequence, US), 其中包括 126 个叠联群(contigs)和 294 条单拷贝 EST(singleton), 最大叠联群长度为 2046bp。

将 420 条 US 与 NCBI 非冗余蛋白数据库进行同源性比较, 共获得 271 条基因注释序列, 占总 US 的 64.5%, 根据分子功能标准对其进行分类(图 3), 其中免疫相关因子的基因序列共 45 条(表 3)。

3 讨论

构建 cDNA 文库和 ESTs 序列筛选是有效地分析功能基因的技术手段, 也是获得功能基因的最直接、最经济的途径(Roeder, 1998; Wolfgang *et al*, 1999; Xu *et al*, 2001; 刘文华等, 2002; Zhulidov *et al*, 2004; Clepet *et al*, 2004; Edery *et al*, 1995; Larade *et al*, 2008)。与扩增文库相比, 原始文库的重复克隆较少, 使获得的 ESTs 代表相同基因的几率降低, 能有效减少重复性和实验成本。本研究在鳃弧菌胁迫下采用 SMART 技术构建的青蛤 cDNA 文库, 病原菌刺激能诱导免疫相关因子基因的表达, 有助于后续免疫相关 ESTs 的筛选。

一般认为, 稀有 mRNA(<14 拷贝/细胞)占总 mRNA 的 30%, 约有 11000 种。因此, 要获得全部稀

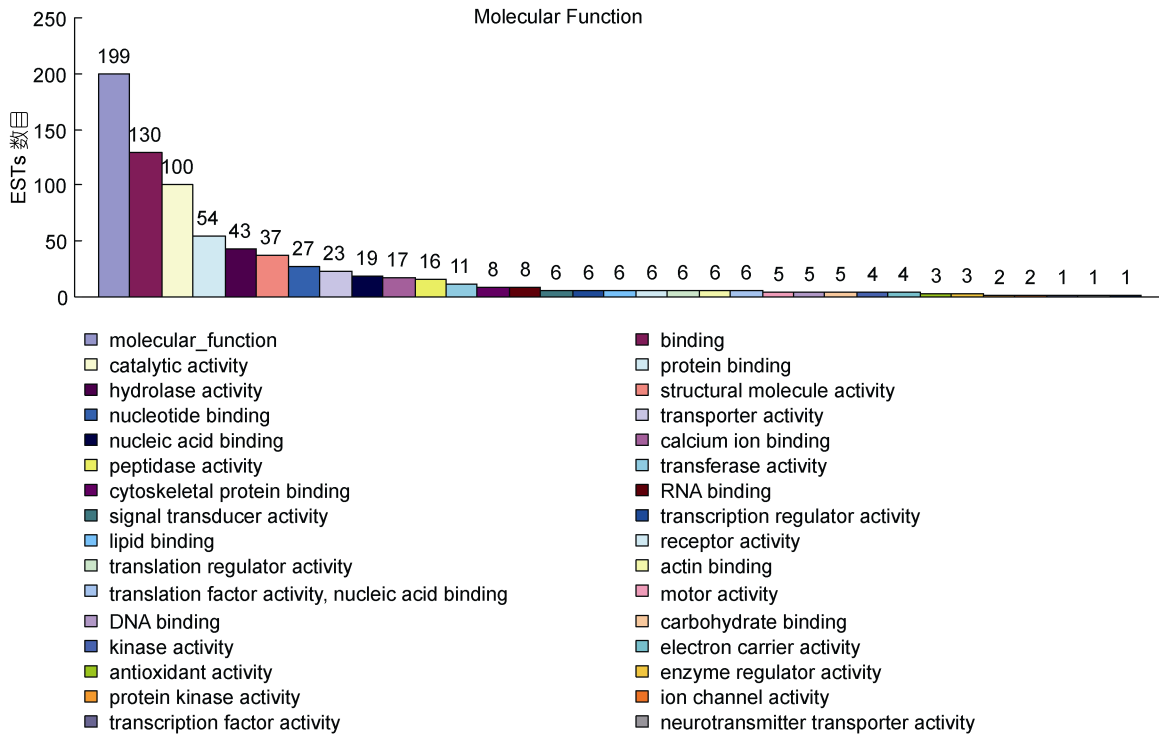


图 3 分子功能标准 ESTs 的分类结果
Fig.3 Classification of ESTs according to molecular function

表 3 免疫相关 EST 类型
Tab.3 The statistics of immune-related ESTs

类型名称	数目
凝集素 Lectin	6
丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine protease inhibitor	1
组织蛋白酶 Cathepsin	7
热休克蛋白 Heat shock protein	3
Toll 样受体 Toll-like receptor	1
清道夫受体 Scavenger receptor	1
肿瘤坏死因子受体 Tumor necrotic factor receptor	1
酪氨酸激酶 Tyrosine kinase	1
干扰素 IFN	1
抗菌肽 Antimicrobial peptides	4
谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase	2
超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	1
胸腺素 Beta thymosin	1
谷胱甘肽转移酶 Glutathione transferase	3
金属结合蛋白 Metal-binding proteins	4
亲环素 Cyclophilin	3
硫氧还蛋白 Thioredoxin	3
B 细胞受体 IgM B-cell recepto	1
金属蛋白酶 Metalloproteinases	1

有 mRNA, 所需的克隆数至少为 11000/30%, 即约为 37000 个。

根据公式: $N = \ln(1-P)/(1-1/n)$, 要以 99% 的概率获得这些稀有 mRNA 的 cDNA 克隆时, 库容量至少为 1.70×10^5 个。而本实验构建的 cDNA 文库库容量为 1.12×10^6 个, 已足够用于某一稀有基因的筛选。

本研究共获得了有效 ESTs 序列有 1113 条, 平均长度达 725bp, 为 ESTs 基因注释奠定了重要基础。其中 420 条一致性序列拼接出的叠联群(contigs)共 126 条, 这些叠连群代表了表达丰度较高的基因, 而 294 条 singletons 代表了表达丰度较低的基因。在所获得的 420 条 US 中, 有 271 条与已知的蛋白编码序列具有较高的相似性, 尽管多数功能基因能被识别, 但仍有 149 条(35.48%)US 序列在已知功能的基因中没有序列相似性。同样的问题也存在于其它海洋生物, 如大西洋鲑鱼(*Salmo sala*)的 1152 条 ESTs 中有 517 条(50%)为新基因(Xu *et al*, 2001)。与其它海洋生物相比, 青蛤 cDNA 文库中未获得注释的基因相对较少, 但其未得到功能注释的基因仍占很高比例, 其原因可能是数据库中相关基因序列还不够丰富, 或者这部分未被识别的基因为青蛤的特异性表达基因, 这些潜在的特异基因可能在贝类进化过程中扮演重要角色。

本研究共筛选出 45 种青蛤免疫因子的相关基因序列, 根据其在软体动物免疫系统中的功能比较, 这些基因可能与抗菌肽、酚氧化酶原系统、凝集系统、模式识别分子和抗氧化蛋白等密切相关。其中部分基因序列为青蛤中率先报道, 有些为软体动物中首次发现, 本研究为青蛤免疫防御基因的克隆分析和非特异性免疫机制的研究奠定了重要基础。

参 考 文 献

- 于业绍, 王 慧, 刘渝仙等, 1994. 青蛤生态与繁殖习性. 海洋科学, 18(2): 17—19
- 王 慧, 于业绍, 刘渝仙等, 1994. 青蛤的土池育苗研究. 海洋科学, 1: 12—13
- 王 慧, 么宗利, 2005. 我国五个青蛤地理群体遗传变异的 RAPD 分析. 海洋渔业, 2: 102—108
- 王兰萍, 耿荣庆, 陈 燕等, 2007. 滩涂养殖青蛤体内细菌菌群的初步分析. 江苏农业科学, 2: 152—153
- 王慧珍, 1991. 浙江动物志——软体动物(帘蛤科). 杭州: 浙江科学技术出版社, 243—256
- 吕 达, 罗凯娅, 潘宝平等, 2012. 青蛤(*Cyclina sinensis*)金属硫蛋白及硫氧还蛋白基因的克隆与表达分析. 海洋与湖沼, 43(1): 47—51
- 刘文华, 王义良, 陈慧萍等, 2002. 玫瑰红绿海葵触手 cDNA 表达文库的构建和初步分析. 生物工程学报, 18: 751—753
- 刘可君, 刘 阳, 潘宝平, 2011. 鳃弧菌侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶和超氧化物歧化酶活性的影响. 四川动物, 30(5): 802—804
- 孙国铭, 万夕和, 刘培庭等, 2004. 通州海区滩涂青蛤死亡原因的初步分析. 水产养殖, 25(2): 26—27
- 李晓英, 沈睿杰, 董志国等, 2009a. 温度骤升和窒息胁迫对青蛤抗氧化酶活性的影响. 中国饲料, 1: 39—42
- 李晓英, 董志国, 薛 洋等, 2009b. 温度骤升和窒息条件对青蛤酸性磷酸酶和溶菌酶的影响. 水产科学, 28(6): 321—324
- 宋 欣, 张丽岩, 高玮玮等, 2010. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)侵染对青蛤(*Cyclina sinensis*)磷酸酶活性的影响. 海洋与湖沼, 41(2): 254—258
- 曹 华, 2004. 沿海滩涂青蛤死亡原因及对策. 中国水产, 4: 57—58
- 潘宝平, 宋 欣, 罗凯娅等, 2010. 青蛤(*Cyclina sinensis*)溶菌酶基因在鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)刺激下的表达. 海洋与湖沼, 41(6): 901—906
- Clepet C, Clainche I L, Caboche M, 2004. Improved full-length cDNA production based on RNA tagging by T₄ DNA ligase. Nucleic Acids Research, 32: e6
- Du L X, Liu S F, Zhu J *et al*, 2007. Construction of SMART cDNA Library of Sheep Ovary and Identification of Candidate Gene by Homologous Cloning. Agricultural Sciences in China, 6: 1390—1395
- Ederly I, Chu L L, Sonenbery N, 1995. An efficient strategy to

- isolate full-length cDNAs based on an mRNA cap retention procedure (CAPture). *Molecular Cell Biology*, 15: 3363—3371
- Larade K, Storey K B, 2008. Constructing and screening a cDNA library. Methods for identification and characterization of novel genes expressed under conditions of environmental stress. *Methods In Molecular Biology*, 410: 55—80
- Liu W S, Ma Y H, Hu S Y *et al*, 2002. Rearing Venus clam seeds, *Cyclina sinensis* (Gmelin) on a commercial scale. *Aquaculture*, 211: 109—114
- Roeder T, 1998. Solid-phase cDNA library construction, a versatile approach. *Nucleic Acids Research*, 26: 3451—3452
- Wolfgang M S, Manfred W M, 1999. CapSelect: A highly sensitive method for 5-CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Research*, 27: 31
- Xu Z D, Jablons D M, Dieter C G, 2001. Expression sequence tag-specific full-length cDNA cloning: actin cDNAs. *Gene*, 263: 265—272
- Zhulidov P A, Bogdanova E A, Shcheglov A S *et al*, 2004. Simple cDNA normalization using Kamchatka crab duplex-specific nuclease. *Nucleic Acids Research*, 32: 37

CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY AND PRELIMINARY SCREENING OF IMMUNE-RELATED GENES IN *CYCLINA SINENSIS*

GAO Wei-Wei¹, PAN Bao-Ping²

(1. Hexi District of Tianjin Community College For Staff, Tianjin, 300203; 2. College of Life Science, Tianjin Key Laboratory of Animal and Plant Resistance, Tianjin Normal University, Tianjin, 300387)

Abstract To investigate the molecular mechanism of immune of *Cyclina sinensis*, a cDNA library infected by *Vibrio anguillarum* was constructed based on SMART technique using Construction Kit (*Clontech*). The result of the test showed that the primary constructed cDNA library had a cloning capacity of 1.12×10^6 and the length of the insert fragments was above 500bp, therefore, the quality of the library could meet the requirements. By conducting high-throughput sequencing on white clones randomly selected from the library and informatics analysis of the sequences, 1113 expressed sequence tags (ESTs) out of which 126 contigs were obtained. Through the BLASTX on NCBI non-redundant protein database comparison, the total number of annotated sequences was 271 (64.5%), including 45 immune related sequences. These results could serve as the foundation of screening and cloning the full-length functional immune genes of *C. sinensis*.

Key words *Cyclina sinensis*, cDNA library, Expressed sequence tags (ESTs), Immune related genes