

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)诱导拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)血淋巴 cDNA 文库构建及表达序列标签初步分析*

蔡小辉 彭银辉 赵鹏 宋忠魁 张琴 黄国强

(广西海洋研究所 广西海洋生物技术重点实验室 北海 536000)

摘要 利用 SMART 技术构建副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)诱导的拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)血淋巴 cDNA 文库。结果表明, 该文库的滴度为 1.04×10^7 CFU/mL, 文库总容量达 1.144×10^7 CFU, 克隆子插入片段大小为 500—2000bp, 重组率达 98%。将随机挑选的 300 个阳性克隆测序, 经过质量控制和拼接, 共得到 141 个单基因组簇(UniGenes), 75 个 UniGenes 与 NCBI 非冗余蛋白质数据库中登录的蛋白质序列存在显著相似性, 其中 20 个与免疫防御相关, 如 kazal-like 丝氨酸蛋白酶抑制剂类蛋白、kazal-type 蛋白酶抑制剂 arasin-like 蛋白、抗内毒素因子、抗微生物肽、金属硫蛋白、铁蛋白、类 70kD 热休克蛋白等, 达总测序数的 6.67%。研究结果证实, 构建 cDNA 文库是获得拟穴青蟹免疫相关基因的可靠途径。

关键词 拟穴青蟹; 副溶血弧菌; cDNA 文库; 表达序列标签

中图分类号 Q785

拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、短尾亚目(Brachyura)、梭子蟹科(Portunidae)、青蟹属(*Scylla*), 具有很高的经济价值和营养价值, 广泛分布于浙江、福建、台湾、广东、广西和海南沿岸水域。由于其具有食性广、适应性强、生长速度快、养殖周期短、耐干露时间长、易运输和养殖效益高等优点, 已逐渐成为我国沿海重要的经济蟹类品种(林琪等, 2008)。青蟹养殖业规模的快速扩张以及日趋严重的环境污染和相对落后的生产管理技术, 导致青蟹病害发生的频率呈逐年上升趋势。其中, 细菌性弧菌病发生的频率较高, 如甲壳溃疡病、颤抖病、黄体病、血淋巴病变等(Yang *et al.*, 2006; Chakraborty *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2008; Macey *et al.*, 2008; Wagley *et al.*, 2009), 不仅给养殖户造成巨大经济损失, 而且严重

阻碍拟穴青蟹的健康养殖发展。

cDNA 文库(complementary DNA library)是生物不同生长发育时期特定组织或器官所转录的全部 mRNA 经反转录形成的 cDNA 与载体连接后形成的克隆的集合(Seki *et al.*, 2009); 表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST)是从 cDNA 文库中大规模随机挑选 cDNA 克隆, 对其 3'端或 5'端进行一步法测序获得的 200—600bp 序列(Adams *et al.*, 1991), 因此, 构建 cDNA 文库是基因筛选和研究的基础, 可以更加快速而有效的获得特征基因, 对基因的功能表达研究具有重要的意义。目前多位专家利用该技术围绕拟穴青蟹繁育工作开展研究(贾锡伟等, 2004; 邹志华等, 2007, 2009), 并获得多个性腺相关基因。纵观国内外报道, 有关拟穴青蟹抗病分子机理方面研究寥寥可数, 仅见 Chen 等(2010)利用消减杂交技术

* 广西自然科学基金资助项目, 2010GXNSFA013079 号, 2012GXNSFAA053065 号; 广西科技攻关资助项目, 1114012-11 号; 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室开放课题, 2011003 号; 国家海洋公益资助项目, 201205028-4 号。蔡小辉, 硕士, 助理研究员, E-mail: caixiaohui66@163.com

通讯作者: 黄国强, 博士, 教授, E-mail: hgqhugh@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-05-26, 收修改稿日期: 2012-07-30

(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)构建了脂多糖诱导拟穴青蟹文库以及以此为基础的免疫基因探究。该研究首次以副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)诱导拟穴青蟹,利用 SMART 技术构建血淋巴 cDNA 文库,并对该文库进行表达序列标签分析,以期为拟穴青蟹的免疫研究和抗病品系的培养创造条件,为预防和治疗弧菌引起的暴发性传染病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用拟穴青蟹雌性成体(250—300g)于2010年9月采集自海南陵水天然海区,于广西海洋研究所竹林海水增殖试验基地养殖约4个月,挑选健康、活泼且四肢健全的个体用于实验;副溶血弧菌菌株由广东海洋大学水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室惠赠。

总 RNA 提取试剂 TRIzol[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司; mRNA 纯化试剂盒(PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems III Kit)购自 Promega 公司; cDNA 合成试剂盒(SMARTer[™] PCR cDNA Synthesis Kit 和 Advantage 2 PCR Kit)购自 Clontech 公司; pGEM-T easy 载体购自 Promega 公司。其余试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 攻毒及血淋巴抽取

使用 1mL 无菌注射器于拟穴青蟹第三胸足基节关节膜处注射 0.3mL 浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 副溶血弧菌。分别在攻毒后 6h、12h、18h、24h,使用含 ACD 抗凝剂(82mmol/L 葡萄糖, 23mmol/L 柠檬酸, 45mmol/L 柠檬酸钠)的无菌注射器于拟穴青蟹基节关节膜处抽取血淋巴,立即离心(800g, 5min),获得血淋巴细胞,用于总 RNA 提取。

1.3 总 RNA 提取和 mRNA 纯化

按照 TRIzol[®] Reagent 说明书操作提取总 RNA,采用核酸蛋白测定仪(Eppendorf, Germany)测定含量及 OD_{260}/OD_{280} 值,分析其浓度和纯度,以 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测完整性。

将不同时间段收集的 RNA 等量混合后,使用 PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems III 试剂盒分离纯化 mRNA,检测方法同总 RNA。

1.4 cDNA 文库构建

按照 SMARTer[™] PCR cDNA Synthesis Kit 说明书进行。以纯化后的 polyA + mRNA 为模板,3' SMART CDS Primer II A 和 SMARTer II A Oligonu-

cleotide 为引物,在反转录酶 SMARTScribe[™] Reverse Transcriptase 作用下转录合成第一链 cDNA。依据 Advantage 2 PCR Kit,以第一链 cDNA 为模板,5' PCR Primer II A 为引物,分别进行 15、18、21、24 和 27 个循环,合成双链 cDNA(ds cDNA)并确定最佳循环数。ds cDNA 经蛋白酶 K 消化,通过 Chroma SPIN-400 分级分离,收集 500bp 以上的 cDNA 片段。经上述处理的 cDNA 与载体 pGEM-T easy 于 4℃ 过夜连接,转化至 100 μ L 新鲜制备的感受态细胞 DH5 α ,加入 1mL LB 培养基,37℃ 200r/min 培养 1.5h,即为全长 cDNA 原始文库,-80℃ 保存。

1.5 cDNA 文库质量鉴定

1.5.1 文库滴度测定 采用倍比稀释计数法鉴定文库滴度(李云峰等,2001)。取 10 μ L 原始文库分别稀释 10、100、1000 倍后,各取 10 μ L 稀释菌液涂布 LB 平板(含氨苄青霉素),37℃ 培养 24h 后统计平板上单克隆菌数,计算文库滴度(CFU/mL)=菌落数 \times 稀释倍数/涂布体积。

1.5.2 文库重组率及插入片段大小检测 根据 cDNA 文库滴度,取适量原始文库涂布至含有 24 μ g/mL 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)和 40 μ g/mL 5-溴-4-氯-吲哚- β -D-半乳糖苷(X-gal)的平板上,37℃ 培养 12h,通过平板上形成的蓝斑和白斑数目计算文库的重组率,公式如下:重组率=(白斑的个数/菌斑总数) \times 100%。

随机挑取 300 个阳性克隆进行菌落 PCR 验证,引物分别为 M13F(5'-GTAAAACGACG GCCAG-3')和 M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。反应体系:菌液 1 μ L, 10 \times PCR buffer 1.0 μ L, Taq DNA 聚合酶为 1U, Mg²⁺浓度为 2.0mmol/L, dNTP 浓度为 0.2mmol/L,引物浓度为 0.2 μ mol/L,加水至 10 μ L。反应条件:94℃ 预变性 4min; 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 3min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 反应在 AG 22331 型 PCR 扩增仪(Eppendorf, Germany)上进行。PCR 扩增产物以 1.2%琼脂糖凝胶电泳(0.5 \times TBE)检测,自动凝胶成像仪(Alpha innotech, USA)观察拍照。

1.5.3 序列测定及分析 随机挑选 500bp 以上的阳性克隆子 300 个送至上海生工生物工程有限公司测序,初次采用 5'端单向测序,人工校正后,部分序列补充 3'端测序。应用 VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>)、DNASTAR5.0、ClustalX1.8 软件去除载体、低质量、重复序列,使用 DNAMAN5.2.2 软件拼接序列,人工检查和校正后获得重叠群(Contigs)和单一序列(Singletons)。使用 NCBI

网站的 Blastx 程序, 对获得的由 Contigs 和 Singletons 组成的单基因组簇(UniGenes)进行蛋白质同源性比较和功能分析, E-value 低于 10^{-10} 或者有连续 25 个氨基酸与数据库中序列有 50%相同为同源基因, 否则为未知蛋白。使用 Gene Ontology 法(<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>)对蛋白家族进行分类。

2 结果

2.1 拟穴青蟹血淋巴总 RNA 提取和 mRNA 纯化

采用 Trizol 方法获取拟穴青蟹血淋巴总 RNA, 经 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测(图 1a)。从电泳结果可以清晰看到 28S、18S 和 5S 三条 rRNA 条带, 其中 28S、18S rRNA 两条主带较 5S rRNA 亮, 且前二者亮度相当; 另外, 使用核酸蛋白测定仪测得 OD_{260}/OD_{280} 为 1.75。以上结果表明本研究提取的总 RNA 未降解、纯度较高, 符合建库要求。

按照 PolyAtract[®] mRNA Isolation Systems III 纯化 mRNA, 取 2 μ L 稀释 25 倍测得含量为 20 μ g/mL, OD_{260}/OD_{280} 为 1.81。1.2%琼脂糖凝胶电泳结果(图 1b)呈弥散状, 说明 mRNA 质量较好, 可用于 cDNA 文库构建。

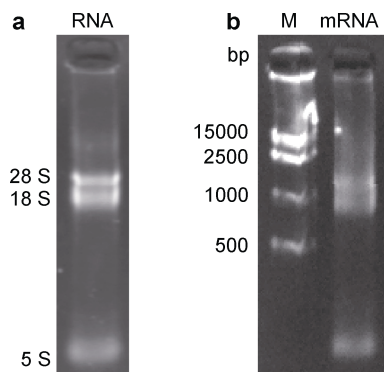


图 1 拟穴青蟹血淋巴细胞总 RNA 和 mRNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 The electrophoretograms of total RNA and mRNA of haemolymph from *S. paramamosain* on agarose gel
注: a. 总 RNA; b. 纯化后 mRNA

2.2 双链 cDNA 合成与纯化

反转录得到单链 cDNA 利用 Advantage 2 PCR kit 进行 LD-PCR 扩增确定最佳循环数并得到双链 cDNA(图 2)。由图 2 可见, PCR 扩增循环数在 15—18 间呈指数趋势, 循环数为 21 时则达到平台期, 根据 SMATerTM PCR cDNA Synthesis Kit 说明书, 确定本实验中最佳循环数为 17, 双链 cDNA 呈弥散状分布, 片段大小主要集中在 500—5000bp, 并且中间有若干较亮带代表高丰度基因, 完全符合建库要求。双链 cDNA 经 Chroma spin-400 柱分级分离后(图 3), 收集 7—10 号分离产物(>500bp)用于连接反应。

2.3 拟穴青蟹血淋巴细胞 cDNA 文库质量鉴定

2.3.1 文库滴度的鉴定 取 10 μ L 原始文库分别稀释 10、100、1000 倍后, 各取 100 μ L 稀释菌液涂布 LB 平板(含氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养 24h 后统计稀释 1000 倍平板上单克隆菌数为 104 个, 文库滴度为 $104 \times 1000 / 0.01 = 1.04 \times 10^7$ CFU/mL, 文库总容量为 1.04×10^7 CFU/mL $\times 1.10$ mL = 1.144×10^7 CFU。

2.3.2 菌落 PCR 验证平均插入片段及重组率 随机挑选 300 个阳性克隆子, 以 M13+和 M13-为引物进行菌落 PCR 检测插入片段大小, 结果表明, 插入片段大小为 500—2000bp(部分电泳结果见图 4)。经蓝白斑筛选统计出文库重组率为 98%。

2.4 EST 测序及初步分析
2.4.1 EST 测序、拼接和注释 对随机挑选的 300 个阳性克隆子进行 5' 端测序(部分双向测序), 得到 270 个有效序列, 去除载体、冗余、3'端 Poly(A) 序列和小于 100bp 序列后, 经过软件 DNAMAN5.2.2

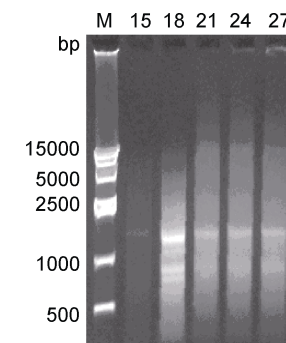


图 2 合成双链 cDNA 最佳循环数确定

Fig.2 Analysis for the optimizing PCR number of ds cDNA synthesis
M: 宽范围 DNA Marker (500—15000bp)

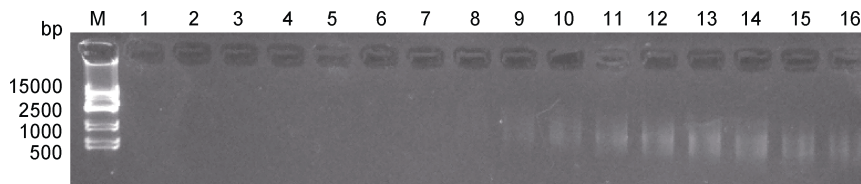


图 3 Chroma spin-400 柱分级分离双链 cDNA 电泳图谱

Fig.3 The electrophoretogram of ds cDNA by Chroma spin-400 fractionation
M: 宽范围 DNA Marker (500—15000bp); 1—16: 1—16 号管收集物

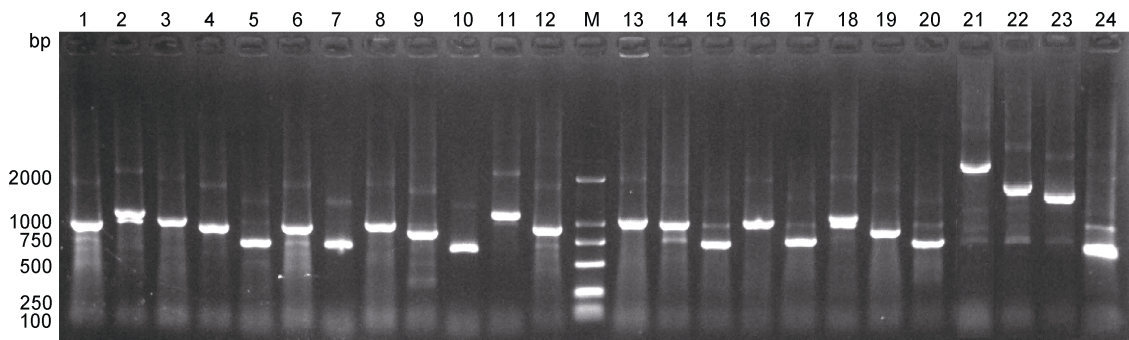


图4 cDNA 文库插入片段电泳检测图谱

Fig.4 The electrophoretogram of inserted DNA fragments from the cDNA library
1—24: 不同阳性克隆插入片段的扩增结果; M: DL2000 标准分子量

拼接后,共得到 141 条 UniGenes, 包含 15 个 Contigs 和 126 个 Singletons。通过 Blastx 搜索比对和注释分析,共有 75 个 UniGenes 与 NCBI 非冗余蛋白质数据库中登录的蛋白质序列存在显著相似性(表 1), 占总数 53.19%, 其它 66 个 UniGenes 通过 Blastx 和 Blastn 搜索未有同源序列, 占总数 46.81%。值得注意的是, 75 个注释基因中, 20 个基因与机体免疫防御相关, 譬如 kazal-like 丝氨酸蛋白酶抑制剂类蛋白、kazal-type 蛋白酶抑制剂、类丝氨酸蛋白酶蛋白、arasin-like 蛋白、抗内毒素因子、抗微生物肽、亲环素 A、金属硫蛋白、铁蛋白、类 70kD 热休克蛋白、VWC 域蛋白等, 达总测序数的 6.67%, 说明拟穴青蟹体内的免疫活动非常活跃。

2.4.2 已知 EST 基因功能分类 利用 Gene Ontology 法将获得注释的 75 个基因进行分类(表 1), 其中 33 个属于分子功能(Molecular Function), 29 个属于生物学过程(Biological Process), 9 个属于细胞组分(Cellular Component), 4 个则未能分类。

3 讨论

3.1 cDNA 文库质量

完整的高质量总 RNA 是成功构建 cDNA 文库的重要保证。一般认为, 真核生物总 RNA 的 28S 约为 18S 的两倍。贾锡伟等(2004)采用 RDP 试剂提取锯缘青蟹(*Scylla serrata*)精巢和卵巢总 RNA 符合上述规律。本实验采用经典 Trizol 方法多次提取拟穴青蟹血淋巴总 RNA, 发现 28S : 18S 1 : 1 (图 1), 溶于水后其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.75, 说明 RNA 完整性较好, 同样现象也于三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)(申望等, 2010)、中国绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(赵大显等,

2010)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)(李吉涛等, 2009)血淋巴总 RNA 中存在, 这可能与物种、组织特异性相关。

cDNA 文库质量鉴定主要包括两部分内容, 即文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性(唐勇等, 2010)。本实验利用 SMART 技术成功构建拟穴青蟹血淋巴 cDNA 文库, 滴度达 1.04×10^7 CFU/mL, 文库总容量达 1.14×10^7 CFU, 即本文库中已包含大部分稀有 mRNA 克隆(库容 1.7×10^7 CFU/mL 包含了 99% 低丰度克隆)(萨姆布鲁克等, 2002)。另外, 文库中克隆子插入片段大小为 500—2000bp, 重组率达 98%, 说明该文库质量较高, 可满足后续实验需求。

3.2 目标基因获取途径

构建 cDNA 文库是快速获得目标基因的有效方式, 针对不同组织基因表达的差异性以及基因在不同逆境下的表达变化, 许多学者运用组织混合或外部刺激方式增加获取目标的几率。邹志华等(2009)利用 SMART 技术构建了锯缘青蟹精巢、卵巢、眼柄、促雄腺等量混合组织的 cDNA 文库, 不仅发现了 12 条与性腺发育、性别分化相关基因, 并且得到 15 条免疫相关基因。Gai 等(2009)使用鳗利斯顿氏菌(*Listonella anguillarum*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等比例混合物诱导中华绒螯蟹 8h 后构建血细胞 cDNA 文库, 获得 221 条免疫相关基因, 占总测序序列的 7.5%, 远远高于 Zhao 等(2009)收集正常中华绒螯蟹血淋巴构建 cDNA 文库所获得的免疫基因比例(0.83%)。Pongsomboon 等(2008)比较斑节对虾(*Penaeus monodon*)正常和感染 WSSV 病毒淋巴器官 cDNA 同样发现, 后者(15.7%)免疫基因比率比前者(2.7%)高达 13%。Chen 等(2010)首次以大肠杆菌

表 1 拟穴青蟹 cDNA 文库部分 ESTs Blast 及其相关蛋白功能分类结果

Tab.1 The Blast and annotation of related-protein functions results of partial ESTs from *S. paramamosain* cDNA library

克隆频率	同源功能蛋白	序列相似性最高物种	E 值	分类
1	Kazal-like serine protease inhibitor-like protein	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	2.00E-31	func_immune activity
1	Kazal-type protease inhibitor	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	4.00E-12	func_immune activity
1	serine proteinase-like protein	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	3.00E-51	func_immune activity
1	arasin-like protein	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	9.00E-05	func_immune activity
1	antilipopolsaccharide factor	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	2.00E-86	func_immune activity
2	antilipopolsaccharide factor 2	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	8.00E-77	func_immune activity
1	crustin antimicrobial peptide	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	6.00E-47	func_immune activity
1	antimicrobial peptide hyastatin	三疣梭子蟹 <i>Portunus trituberculatus</i>	3.00E-52	func_immune activity
1	Uncharacterized peptidase C1-like protein F26E 4.3	印度跳蚁 <i>Harpegnathos saltator</i>	2.00E-53	func_immune activity
2	cyclophilin A	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	7.00E-97	func_defence activity
1	metallothionein	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	1.00E-38	func_defence activity
1	histone-lysine N-methyltransferase EHMT1-like isoform 1	苜蓿切叶蜂 <i>Megachile rotundata</i>	5.00E-15	func_defence activity
1	guanine nucleotide-binding protein subunit gamma-1-like	丽蝇蛹集金小蜂 <i>Nasonia vitripennis</i>	2.00E-21	func_defence activity
1	ferritin	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	1.00E-115	func_defence activity
2*	70kD heat shock-like protein	克氏原螯虾 <i>Procambarus clarkii</i>	3.00E-80	func_defence activity
1	profilin	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	2.00E-85	func_defence activity
1	single VWC domain protein 4	凡纳滨对虾 <i>Litopenaeus vannamei</i>	4.00E-09	func_defence activity
1	cytochrome b-c1 complex subunit 10	丽蝇蛹集金小蜂 <i>N. vitripennis</i>	7.00E-06	func_electron carrier activity
2	cytochrome b	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	9.00E-126	func_electron carrier activity
3	cytochrome c oxidase subunit I	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	5.00E-165	func_oxidoreductase activity
1	cytochrome c oxidase subunit II	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	4.00E-123	func_oxidoreductase activity
1	cytochrome c oxidase subunit III	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	2.00E-65	func_oxidoreductase activity
1	Glutaminase	家蝇 <i>M. domestica</i>	4.00E-61	func_hydrolase activity
1	Cuticle protein 7	鱼虱 <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	2.00E-16	func_structural molecule activity
1	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	红原鸡 <i>Gallus gallus</i>	4.00E-10	func_hydrolase activity
1	GABA(A) receptor-associated protein	杂色鲍 <i>Haliotis diversicolor</i>	1.00E-74	func_receptor activity
1	upstream activation factor subunit spp27-like	豌豆蚜 <i>Acyrtosiphon pisum</i>	1.00E-16	func_transcriptional activity
2	immediate early response 3-interacting protein 1-like	紫海胆 <i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	2.00E-19	proc_regulation of apoptotic process
1	WD-repeat protein, putative	人体虱 <i>Pediculus humanus corporis</i>	1.00E-49	proc_cell division
1	serine/threonine-protein kinase VRK1 isoform c	小家鼠 <i>Mus musculus</i>	1.00E-72	proc_cell division
1	Casein kinase II subunit alpha	印度跳蚁 <i>H. saltator</i>	2.00E-42	proc_mitotic cell cycle spindle check-point
1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit G	斑节对虾 <i>Penaeus monodon</i>	4.00E-143	proc_translational initiation
1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit c	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	1.00E-149	proc_translational initiation
1	eukaryotic initiation factor 4A	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	2.00E-13	proc_translational initiation
1	ubiquitin	拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	1.00E-82	proc_translation
1	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC5	狼鲈 <i>Dicentrarchus labrax</i>	2.00E-33	proc_transcription
1	mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 isoform 2	丽蝇蛹集金小蜂 <i>N. vitripennis</i>	6.00E-57	proc_regulation of transcription
1	NHP2-like protein 1	印度跳蚁 <i>H. saltator</i>	5.00E-54	proc_RNA splicing
1	tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 4-like	丽蝇蛹集金小蜂 <i>N. vitripennis</i>	7.00E-15	proc_dephosphorylation
1	beta-I tubulin	大西洋龙虾 <i>Homarus americanus</i>	8.00E-138	proc_microtubule-based movement

续表 1

克隆频率	同源功能蛋白	序列相似性最高物种	E 值	分类
1	ADP-ribosylation factor, putative	人体虱 <i>P. humanus corporis</i>	9.00E-08	proc_signal transduction
1	Ras-related protein Rab-21	猕猴 <i>Macaca mulatta</i>	9.00E-44	proc_protein transport
13*	ribosomal-related protein	大步牛杆菌 <i>Carabus granulatus</i>	8.00E-144	proc_cellularbiosynthetic process
1	LYR motif-containing protein 5	鸣禽斑胸草雀 <i>Taeniopygia guttata</i>	3.00E-22	component_mitochondrion
1	WD repeat and FYVE domain-containing protein 3	佛罗里达弓背蚊 <i>Camponotus floridanus</i>	6.00E-48	component_autophagic vacuole
1	protein transport protein SEC61 alpha subunit	肩胛真壁虱 <i>Ixodes ixodes scapularis</i>	1.00E-65	component_membrane
2	transport protein Sec61 beta subunit	家蚕 <i>Bombyx mori</i>	1.00E-11	component_membrane
2	UPF0463 transmembrane protein C6orf35-like protein	切叶蚁 <i>Acromyrmex echinator</i>	2.00E-33	component_membrane
2*	beta-actin	脊尾对虾 <i>Exopalaemon carinicaud</i>	0	component_cytoskeletal

注: *表示最高 E 值和最相似物种

(*Escherichia coli*)的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)为外源刺激物,同一只拟穴青蟹为材料来源载体,分别收集正常和诱导 20h 的血淋巴,成功构建消减杂交文库,在测序的 721 个阳性克隆中首次发现 253 个基因(35.09%),免疫防御相关基因 23 个(3.19%)。本实验以 0.3ml 浓度为 1.0×10^7 CFU/mL 副溶血弧菌为外源物质诱导拟穴青蟹,并于攻毒后 6、12、18、24h 收集血淋巴构建 cDNA 文库。将随机挑选的 300 个阳性克隆测序分析后得到 141 个 UniGenes,其中 75 个 UniGenes (53.19%)与 NCBI 非冗余蛋白质数据库中登录的蛋白质序列具有同源序列,20 个基因与免疫防御相关,如 kazal-like 丝氨酸蛋白酶抑制剂类蛋白、kazal-type 蛋白酶抑制剂、类丝氨酸蛋白酶蛋白、arasin-like 蛋白、抗内毒素因子、抗微生物肽、亲环素 A、金属硫蛋白、铁蛋白、类 70kD 热休克蛋白、VWC 域蛋白等,达总测序数的 6.67%,高于 Chen 等(2010)利用 LPS 诱导拟穴青蟹 SSH 文库中免疫防御基因比例(3.19%)。产生这一现象可能是有以下两种原因:一是本实验中使用一定浓度具有侵染力的副溶血弧菌活体诱导拟穴青蟹,使机体在较短时间内处于应激状态,产生大量免疫相关基因来应付外源物质入侵;二是由于病原体侵入后,机体自身不同免疫基因的启动存在时间差异(Gai *et al*, 2009),本实验则采用经典 Trizol 方法将来自攻毒后不同时间段血淋巴细胞分别提取总 RNA 等量混合避免遗漏捕获免疫基因,增加免疫基因获得率,为蟹类和其它甲壳动物高比例免疫基因发现提供了一个较好的来源。

3.3 表达序列标签

获得的序列进行比对时,笔者发现本文库与 Chen 等(2010)构建的拟穴青蟹消减文库存在许多相同之处。一方面是高比例的新基因:本文库中 66 个

UniGenes(46.81%)与 NCBI 非冗余蛋白质数据库中登录的蛋白质序列未有同源序列,消减杂交文库中未知功能基因的比例为 33.9%,如此高比例的新基因出现从侧面反应出拟穴青蟹在转录水平上的复杂性(Wang *et al*, 2006);另一方面,在 Blastx 比对时发现,多个基因(19 个 Unigenes)与 Chen 等(2010)利用 LPS 诱导拟穴青蟹血淋巴文库序列存在高度同源性(表 1),例如:金属硫蛋白、Kazal-like 丝氨酸蛋白酶抑制蛋白、类丝氨酸蛋白酶蛋白、抗内毒素因子、细胞色素氧化酶 I/II/III、泛素、纤维蛋白、crustin 抗菌肽、arasin-like 蛋白等,从侧面揭示拟穴青蟹受到不同外源物质(副溶血弧菌或者脂多糖)刺激后,机体自身针对外源物质入侵作出了相类似的免疫应答过程,这一结果可能为开发拟穴青蟹疫苗以及疾病有效治疗提供一种新思路。

参 考 文 献

- 申 望, 叶 茂, 石 戈等, 2010. 三疣梭子蟹血细胞全长 cDNA 文库构建及 EST 初步分析. 海洋渔业, 32(1): 24—29
- 李云峰, 刘卫东, 高祥刚等, 2001. 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
- 李吉涛, 李 健, 陈 萍等, 2009. 中国明对虾“黄海 1 号”血细胞和肌肉 cDNA 文库的构建. 中国水产科学, 16(5): 781—785
- 邹志华, 张子平, 王艺磊等, 2007. 锯缘青蟹卵巢均一化 cDNA 文库的构建. 福建水产, (4): 1—4
- 邹志华, 张子平, 王艺磊等, 2009. 锯缘青蟹性腺发育与性别分化相关组织混合线性化 cDNA 文库构建及 EST 初步分析. 热带海洋学报, 28(6): 88—94
- 林 琪, 李少菁, 黎中宝等, 2008. 中国东南沿海青蟹属不同种类的 mtDNA COI 基因序列分析及其系统发育. 厦门大学学报(自然科学版), 42(2): 268—273
- 赵大显, 陈立侨, 2010. 中华绒螯蟹免疫相关基因的研究进展. 水产科学, 29(4): 243—248

- 贾锡伟, 王艺磊, 张子平等, 2004. 利用 SMART 技术构建锯缘青蟹精巢和卵巢的 cDNA 文库. 厦门大学学报(自然科学版), 43(4): 547—550
- 唐 勇, 刘 旭, 周定刚, 2010. 黄鳍肠道 cDNA 文库构建及营养相关表达序列标签分析. 动物营养学报, 22(4): 992—999
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 著, 2002. 黄培堂译. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 862—864
- Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D *et al*, 1991. Complementary DNA Sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252(5013): 1651—1656
- Chakraborty R D, Surendran P K, Joseph T C, 2008. Isolation and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from seafoods along the southwest coast of India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10): 2045—2054
- Chen F Y, Liu H P, Bo J *et al*, 2010. Identification of genes differentially expressed in hemocytes of *Scylla paramamosain* in response to lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 28(1): 167—177
- Feng Z F, Wang G L, Qian D *et al*, 2008. Microbial flora and quantitative distribution of bacteria in culture ponds of mud crab *Scylla serrata*. *Fisheries Science*, 27(11): 574—577
- Gai Y C, Wang L L, Zhao J M *et al*, 2009. The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 27(6): 684—694
- Macey B M, Rathburn C K, Thibodeaux K *et al*, 2008. Clearance of *Vibrio campbellii* injected into the exposure to bacteria and environmental hypoxia. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(6): 718—730
- Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S *et al*, 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(5): 485—493
- Seki M, Kamiya A, Carninci P *et al*, 2009. Generation of full-length cDNA libraries: focus on plants. *Methods in Molecular Biology*, 533: 1—20
- Wagley S, Koofhethile K, Rangdale R, 2009. Prevalence and potential pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* in Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) harvested from the River Thames estuary, England. *Journal of Food Protection*, 72(1): 60—65
- Wang Y C, Yang C P, Liu G F *et al*, 2006. Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA Library of *Tamarix androssowii*. *Plant Science*, 170(1): 28—36
- Yang Y, Kaneniwa M, Satomi M *et al*, 2006. Occurrence and density of *Vibrio parahaemolyticus* in live edible crustaceans from markets in China. *Journal of Food Protection*, 69(11): 2742—2746
- Zhao D X, Song S H, Wang Q *et al*, 2009. Discovery of immune-related genes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by expressed sequence tag analysis of hemocytes. *Aquaculture*, 287(3—4): 297—303

CONSTRUCTION OF HAEMOLYMPH cDNA LIBRARY OF *SCYLLA PARAMAMOSAIN* INDUCED BY *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND ANALYSIS OF EXPRESSED SEQUENCE TAGS

CAI Xiao-Hui, PENG Yin-Hui, ZHAO Peng, SONG Zhong-Kui,
ZHANG Qin, HUANG Guo-Qiang

(Guangxi Institute of Oceanology, Key Laboratory of Marine Biotechnology of Guangxi, Beihai, 536000)

Abstract To obtain the potential immune-related genes and explore their function, the cDNA library of haemolymph from *Scylla paramamosain* induced by *Vibrio parahaemolyticus* was constructed by SMART technology. The results show that the titer of the library was 1.04×10^7 CFU/mL, the library capacity reached 1.14×10^7 CFU, the range of the cDNA inserts was 500—2000bp, and the recombinant rate was about 98%. A total of 300 clones of the library were randomly picked out and sequenced, and 270 raw sequences of the ESTs were processed and then assembled into 141 unigenes. Blast analysis show that 75 unigenes had significant homology to genes with known or putative protein function in non-redundant protein database of NCBI. There were 20 unigenes, 6.67% of total ESTs, related with immune defence functions, such as Kazal-like serine protease inhibitor-like protein, Kazal-type protease inhibitor, arasin-like protein, antilipopolysaccharide factor, antimicrobial peptide, metallothionein, ferritin, 70kD heat shock-like protein and so on. All above results confirm that constructing high-quality cDNA library was a reliable tool to screen out immune-related genes of *S. paramamosain*.

Key words *Scylla paramamosain*; *Vibrio parahaemolyticus*; cDNA library; Expressed sequence tags