

# 可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)酵母 双杂交文库和铁结合蛋白真核表达载体的构建\*

张云云<sup>1</sup> 周君<sup>1</sup> 李晔<sup>1</sup> 张春丹<sup>1</sup> 蔡江佳<sup>1</sup>  
陈丽萍<sup>1</sup> 李太武<sup>2</sup> 苏秀榕<sup>1</sup>

(1. 宁波大学海洋学院 宁波 315211; 2. 宁波城市职业技术学院 宁波 315100)

**摘要** 构建了可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)的酵母双杂交文库, 总克隆数为  $6.09 \times 10^6$  CFU, 重组率 100%, 平均插入片段长度 >1kb。随机挑取 200 个克隆子测序, 结果 1 个空载, 67 个无法对应的基因类型, 已知的 132 个基因中线粒体蛋白占 29.54%, 蚯蚓血红蛋白 15.9%, 核糖体蛋白 10.6%, 铁结合蛋白 8.3%, 肌动蛋白 6.1%, 其它基因 29.56%。这些基因分别为: 5-氨基乙酰丙酸合成酶、类博莱霉素水解酶、纤溶蛋白、谷氨酰胺合成酶、热休克蛋白、非特异性类碱性磷酸酶、脂肪酶、金属蛋白、线粒体、硫氧还蛋白、蛋白磷酸酶、肌钙蛋白 C、泛素。根据已获得的可口革囊星虫铁结合蛋白基因, 以 *EcoR* 和 *Kpn* 为双酶切位点设计引物, 构建了可口革囊星虫铁结合蛋白真核表达载体 pPink-HC-fer, 经 PCR 及测序检验, 序列完全正确, 然后电转化至酵母细胞中诱导表达, 经 SDS-PAGE 检验其融合蛋白分子量大小约为 23kDa。

**关键词** 可口革囊星虫; 铁结合蛋白; 酵母双杂交文库; 真核表达  
**中图分类号** Q953

可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)俗称海丁、沙虫, 属于星虫动物门(Sipuncula)、革囊星虫纲(Phascolosomatidea)动物, 其体柔长圆筒形, 无体节, 无刚毛, 为我国的特有种, 分布于福建、浙江、广东沿海(纪其雄等, 2007)。可口革囊星虫营养丰富, 味道鲜美。现代医学研究表明, 海洋星虫含有丰富的蛋白质、不饱和脂肪酸、氨基酸、无机元素等营养物质, 具有延缓衰老、抗氧化、抗疲劳、耐缺氧、耐高温、抗辐射及溶栓等功效(周化斌等, 2006; 牛荣丽等, 2011)。它栖息于潮间带, 营底栖生活, 以硅藻、有机碎屑为食(李德伟等, 2008)。近年来随着工业的发展, 排出废水中重金属离子大幅度增加, 它们随地表径流汇聚入海, 成为近海环境的污染源, 对栖息于潮间带滩涂中的生物生存与生长带来不良的影响(曾海祥

等, 2006; 陈丽萍等, 2013)。由于可口革囊星虫具有较强的重金属耐性(李懿等, 2008), 它在重金属污染区能够很好地生长。而铁蛋白是存在于可口革囊星虫中的功能性蛋白, 它对可口革囊星虫能够适应富含重金属的环境起着很大的决定作用(Su *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010)。

铁结合蛋白(ferritin)也称铁蛋白, 是一类存在于动植物和微生物中的一种保守性较高的多功能、多亚基的生物蛋白, 它是由 24 个亚基组成的 450kDa 巨大复合体(王群力等, 2004)。铁结合蛋白的主要生理功能是富集生物体内较高的铁离子, 使机体免受侵害(杜莉利等, 2008; 贺静静等, 2009)。大量的研究表明, 铁结合蛋白除了具有富集铁离子的功能外, 还能富集很多其它的重金属离子(Li *et al.*, 2012)。为了充分利

\* 国家自然科学基金资助项目, 40776075 号, 41176123 号; 海洋公益性行业科研专项经费资助项目, 201005016 号; 宁波市科技局资助项目, 2008C50027 号。张云云, 硕士研究生, E-mail: zhangyunnyun-lbl@outlook.com

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

收稿日期: 2012-04-19, 收修改稿日期: 2012-07-13

用这一优势,本研究构建可口革囊星虫的酵母双杂交文库和铁结合蛋白的真核表达系统,为进一步研究铁结合蛋白的应用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

可口革囊星虫取自奉化松岙水养殖公司。大肠杆菌 DH5 由本实验室保存,载体 pMD18-T、*Taq* DNA 聚合酶、*T<sub>4</sub>* 连接酶购自 TaKaRa 公司,酵母双杂交基因文库所需试剂盒与真核表达试剂盒均购于英潍捷基(上海)贸易有限公司。内切酶 *EcoR*、*Kpn* 购自 NEB 公司, M-MLV 反转录试剂盒购自 BBI 公司, DNA 片段纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程公司,其它试剂购于宁波化学试剂公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 酵母双杂交 cDNA 文库(三框型)的构建

**1.2.1.1 总 RNA 的提取及纯化** 取星虫体壁和体液,按 TRIzol 说明书提取总 RNA。参照 FastTrack<sup>®</sup> MAG mRNA 提取试剂盒说明书进行 mRNA 纯化,检测浓度和质量(秦玉明等,2010)。

**1.2.1.2 Uncut 型 cDNA 文库的构建** 第一链 cDNA 的合成参照 CloneMiner 说明书进行,在 0.5mL 微量管中依次加入 1、2、3、4、5μg mRNA,分别用 DEPC 水补足 12μL,加入 biotin-attB2-Oligo (dT) Primer (30pmol) 1μL 混匀,65℃ 5min,降温到 45℃ 孵育 2min;加入第一条链 5 × Buffer 4μL, DTT (0.1mol/L) 2μL, dNTPs (10mmol/L) 1μL, 45℃ 孵育 2min;分别加入 1、2、3、4、5μL SuperScript III RT 酶,PCR 仪上 45℃ 20min; 50℃ 20min; 55℃ 20min。

第二链 cDNA 的合成:在第一条链的 20μL 体积中加入 DEPC 水 91μL,第二条链的 5 × Buffer 30μL, 10mmol/L dNTPs 3μL, DNA 连接酶(10U/μL) 1μL, DNA 聚合酶 I (10U/μL) 4μL, RNaseH (2U/μL) 1μL, 总体积 150μL, 16℃, 2h。加入 *T<sub>4</sub>* DNA 聚合酶 2μL, 16℃, 5min;加入 0.5mol/L EDTA (pH 8.0) 10μL;分离纯化。

cDNA 与三框 attB1 重组接头连接: cDNA 6μL, Adapter 5 × Buffer 10μL, attB1 Adapter (1μg/μL) 10μL, 0.1mol/L DTT 7μL, *T<sub>4</sub>* DNA 连接酶(1U/μL) 5μL, DEPC 水补足 50μL。混匀后 16℃, 16—24h。按照试剂盒要求纯化产物。

BP 重组反应: cDNA 14μL, pDONR222 (250ng/μL)

1μL, BP Clonase<sup>®</sup> II 混合物 4μL, 总体积 20μL。混匀后置于 25℃, 16—20h。

电转化大肠杆菌 DH10B: BP 重组反应体系中加入 2μL 的蛋白酶 K, 37℃, 15min, 75℃, 10min。纯化后用 8μL 的 TE Buffer 反复吹打 30—40 次,溶解 cDNA 电转,培养后铺平板。

库容量的鉴定:取转化后细菌原液 10μL 稀释 100 倍后,从中取出 50μL 涂布 LB 平板(含相应抗性),第二天计数。

$$\text{CFU/mL} = \text{平板上的克隆数} / 50\mu\text{L} \times 100 \text{ 倍} \times 1 \times 10^3 \mu\text{L}$$

重组率和插入片段长度鉴定:随机挑取 24 个克隆进行菌落 PCR 鉴定。

**1.2.1.3 酵母双杂交 cDNA 文库的构建** Uncut 文库的质粒抽提:将合格的 Uncut 文库菌用肉汤培养基 30℃ 培养过夜,第二天中抽质粒,质粒测 OD 并电泳检测。

质粒重组:质粒(300ng/μL 1μL), pGADT7-DEST (300ng/μL) 1μL, LR Clonase II 混合液 4μL, ddH<sub>2</sub>O 14μL 总体积 20μL。混匀后置于 25℃, 16—20h 后,产物纯化,将其电转化至大肠杆菌 DH10B,将电转物取入到新的 15mL 离心管,置于 37℃, 225—250r/min 摇床培养 1h;培养结束后,用于库容量鉴定;剩余培养物加入甘油至终浓度 20%存于-80℃,此即为文库菌液。

库容量的鉴定同上。

**1.2.1.4 序列测定与分析** 将原始文库用培养基进行 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-6</sup> 稀释后,涂布于含 30μg/mL 氯霉素的 LB 平板上,随机挑选 458 个菌落进行测序,测序结果与 GenBank 数据库中公布的已知基因进行序列同源性比较。

### 1.2.2 铁结合蛋白真核表达载体的构建

**1.2.2.1 引物的设计与合成** 根据本实验室已获得的可口革囊星虫基因序列设计一对引物,两端酶切位点分别为 *EcoR* 和 *Kpn*,由上海生工生物工程有限公司合成。

上游引物 XCferF: 5'-CGGAATTCGAAACGATG-TCTCTGTCAAGA-3'

下游引物 XCferR: 5'-GCAGGTACCTTAGCTGT-CGCCATC-3'

**1.2.3 总 RNA 的提取及质粒模板的制备** RNAiso 试剂提取可口革囊星虫血液中总 RNA, M-MLV 反转录试剂盒合成单链 cDNA 作为 PCR 模板扩增 ferritin

基因, 反应条件为: 95℃预变性 5min, 94℃45s, 60℃45s, 72℃45s, 共 30 个循环, 最后 72℃延伸 10min, 电泳检测。产物经回收试剂盒纯化后, 16℃连接 pMD18-T 载体 6h, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄青霉素 LB 固体培养基, 37℃过夜培养。单克隆菌落 PCR 检测, 并送 Invitrogen 公司测序, 挑取阳性克隆加入到含氨苄青霉素 LB 培养基培养 24h, 菌液用质粒回收试剂盒提取 pMD18-T-fer 作为模板。

**1.2.4 重组质粒的构建** 取 pMD18-T-fer 质粒和表达载体 pPink-HC 用 *EcoR* 和 *Kpn* 双酶切 5h, 回收纯化载体 pPink-HC 与目的基因片段, 按物质的量 1 : 7 的比例,  $T_4$  连接酶 16℃连接过夜, 转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂布于含氨苄青霉素 LB 固体培养基, 37℃培养过夜。挑取单克隆菌落 PCR 扩增检测, 反应体系同上, 阳性克隆送 Invitrogen 公司测序, 挑取阳性克隆扩增培养, 并提取重组质粒 pPink-HC-fer。

**1.2.5 酵母细胞培养** 取试剂盒中的酵母 1 号少许涂平板于 YPD 固体培养基上 28℃生长 2d; 挑取单菌落至 10mL YPD 液体培养基中 28℃培养 12h; 取 30 $\mu$ L 菌液至 50mL YPD 液体培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 1.3—1.5 范围内。之后将细胞液在 1500  $\times$  g、4℃条件下离心 5min, 弃上清, 沉淀加 50mL ddH<sub>2</sub>O 重复离心步骤、弃上清后沉淀加 25mL 1mol/L 山梨醇重复离心步骤; 最后获得的沉淀加入 150 $\mu$ L 的 1mol/L 山梨醇, 冰上备用。

**1.2.6 电转化** 取 40 $\mu$ L 当日制备的电转用细胞和 5 $\mu$ L 重组质粒混合, 转移至预冷的电转杯中冰浴 5min; 在 2000V、25 $\mu$ F、200 条件下电转 5ms, 电转后冰浴, 并立即加 1mL 预冷的 YPDS 液体培养基, 充分混合, 28℃静置培养 2h 后, 取 200 $\mu$ L 菌液涂布于 PAD 平板上, 28℃培养 2d; 挑取白色克隆子, PCR 检测。

**1.2.7 真核表达及分析** 挑取阳性单克隆于 10mL

BMGY 培养基中, 30℃培养 1d; 转移酵母至离心管中, 室温 1500  $\times$  g 条件下离心 5min; 弃去 BMGY 上清, 加入 1mL BMMY 培养基重悬酵母细胞, 将 BMMY 培养基中的酵母细胞重新放入 30℃振荡培养过夜; 次日取 100 $\mu$ L 样品进行 SDS-PAGE 分析; 取 100 $\mu$ L 40% 甲醇, 加入到剩余的酵母液体中, 30℃继续培养过夜, 之后 1500  $\times$  g、离心 10min 收集酵母细胞, 上清、沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果

### 2.1 酵母双杂文库

**2.1.1 总 RNA 的质量** 从图 1a 电泳条带可以看出 28S 与 18S 的亮度比接近 2 : 1, 即可认定该样品总 RNA 的完整性良好。图 1b 为 mRNA 电泳结果其片段均大于 500bp, 无降解。可用于文库的构建。

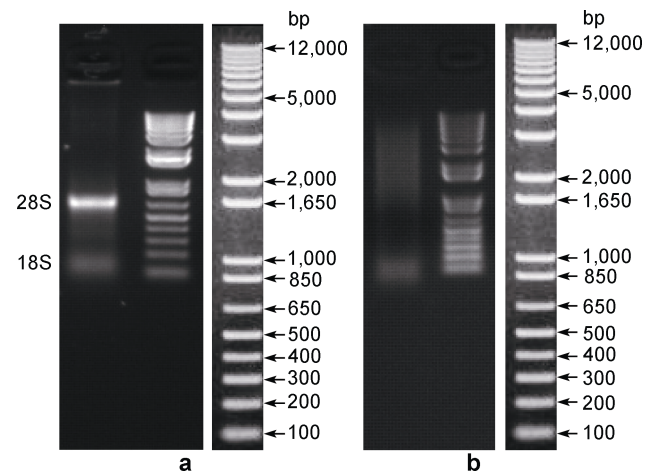


图 1 可口革囊星虫总 RNA (a) 及 mRNA (b) 电泳图

Fig.1 The pattern of total RNA (a) and mRNA (b) of *P. esculenta*

**2.1.2 Uncut 文库** 总克隆数为  $6.19 \times 10^6$  CFU, 重组率 100%, 平均插入片段长度 > 1.2kb (图 2)。

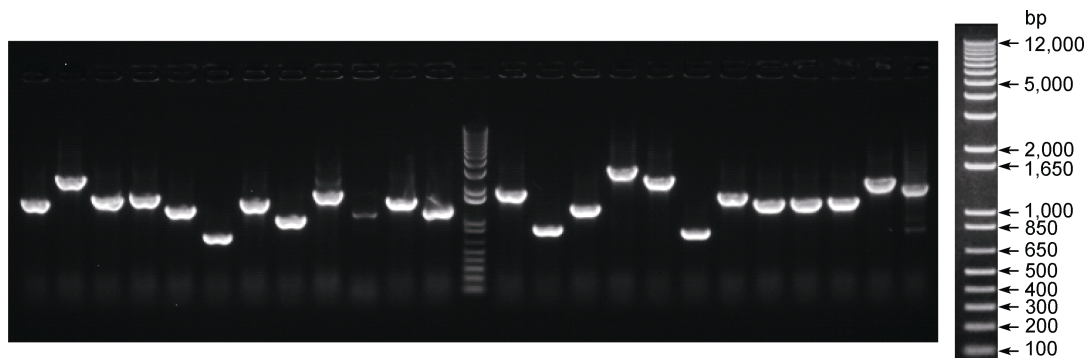


图 2 Uncut 文库插入片段长度检测电泳图

Fig.2 The size of the inserted fragment pattern of Uncut library

**2.1.3 酵母双杂交文库** 总克隆数为  $6.09 \times 10^6$  CFU, 重组率 100%, 平均插入片段长度  $>1$  kb (图 3)。

**2.1.4 序列测定及生物信息学分析** 对 200 个克隆子进行了测序, 其中 1 个空载, 67 个无法对应的基因类型, 已知的 132 个基因中线粒体蛋白占 29.54%, 蚯蚓血红蛋白 15.9%, 核糖体蛋白 10.6%, 铁结合蛋白 8.3%, 肌动蛋白 6.1%, 其它基因 29.56%。这些基因为: 5-氨基乙酰丙酸合成酶(5-amino levulinate synthase)、类博莱霉素水解酶(bleomycin hydrolase-like)、纤溶蛋白(fibrinolytic protein)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase)、热休克蛋白(heat shock protein 70, 90)、非特性类碱性磷酸酶(nonspecific alkaline phosphatase-like)、脂肪酶(lipase)、金属蛋白(metalloprotein)、线粒体(mitochondrion)、硫氧还蛋白(thioredoxin-2-like)、蛋白磷酸酶(protein phosphatase)、肌钙蛋白 C(troponin C)、泛素(ubiquitin)。

## 2.2 可口革囊星虫铁结合蛋白基因的真核表达

**2.2.1 PCR 检测结果** PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 星虫 ferritin 基因 ORF 长度为 525bp, 两端酶切位点和保护碱基共为 23bp, PCR 产物长度应为 548bp。图 4 显示在略大于 500bp 位置具有单一、明亮条带; 测序结果与已有的 ferritin 基因序列比对, 两者完全吻合。

**2.2.2 重组质粒 pPink-HC-fer PCR 及测序检测结果** 取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物长度应为 548bp, 如图 5a 所示, 在略大于 500bp 位置具有单一的明亮条带, 结果一致, 将测序返回的目的序列与已有的 ferritin 基因序列比对, 序列完全吻合。

**2.2.3 电转化后 PCR 检测结果** 电转化后 PCR 检测产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 星虫 ferritin 基因 ORF 长度为 525bp, pPink-HC 载体两端序列长度为 157bp, 扩增长度应为 742bp, 图 5b 显示电泳在 750bp 左右位置具有明亮的单一一条带, 结果一致。

## 2.3 SDS-PAGE 检测结果

经 12% SDS-PAGE 电泳分析, 星虫铁蛋白分子量约为 20kDa, 由于质粒 pPink-HC 在多克隆位点上游有一段编码序列, 分子量约为 3kDa, 故融合蛋白分子量大小约为 23kDa; 图 6a 中, 1 号、2 号样品在相对分子量 29.0kDa 与 20.1kDa 之间无明显的条带, 3 号样品有与预测结果相符合的条带; 图 6b 中, 1 号样品条带与预测结果相符, 2 号样品无条带显现, 说明 pPink-HC-fer 重组蛋白为胞内表达。

## 3 讨论

酵母双杂交技术也称蛋白质捕获系统, 是 20 世纪 90 年代兴起的一种研究蛋白质-蛋白质相互作用的

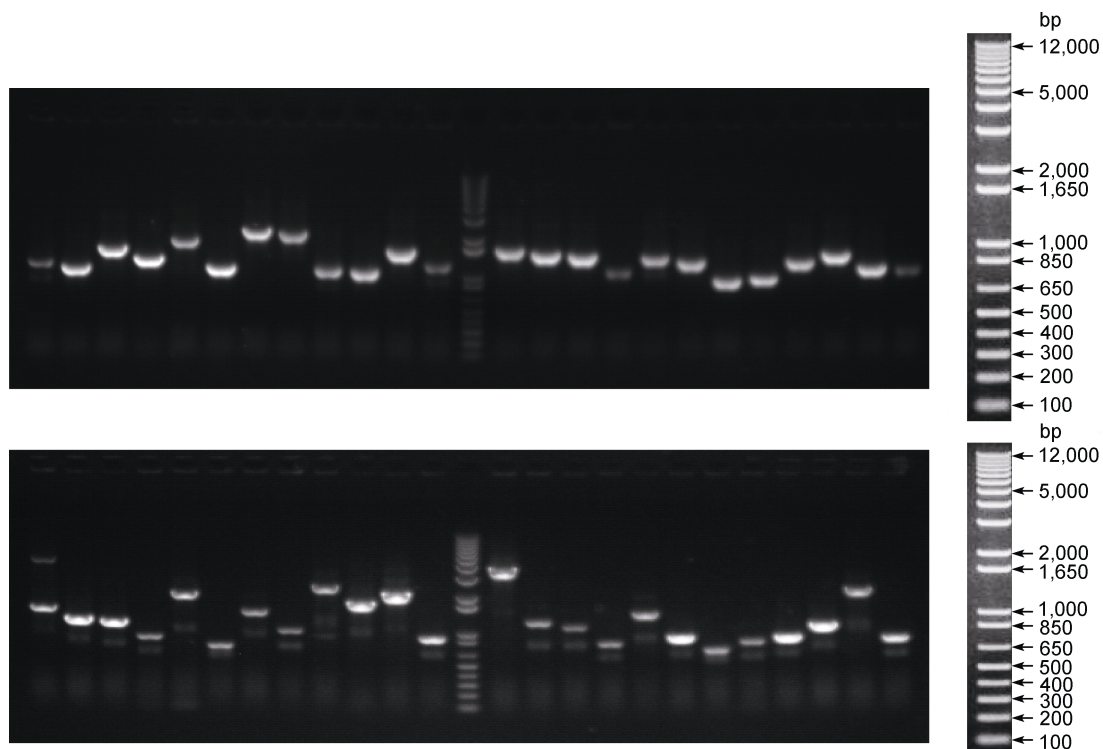


图 3 酵母双杂交文库插入片段长度检测电泳图谱

Fig.3 The size of the inserted fragment pattern of yeast two-hybrid library

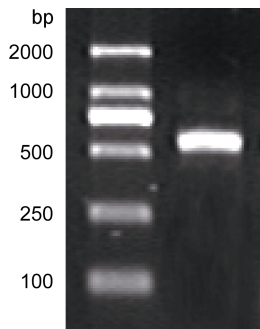


图4 pMD18-T-fer 阳性克隆检测电泳图

Fig.4 pMD18-T-fer plasmid of positive clones and the identification result

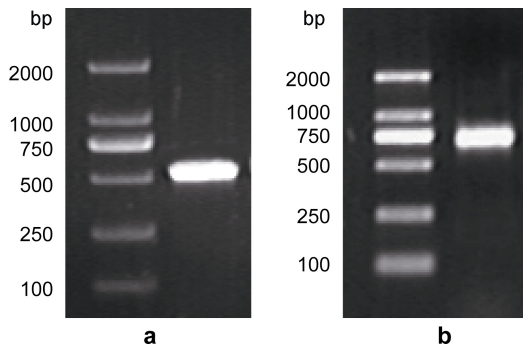


图5 pPink-HC-fer 阳性克隆检测电泳图谱(a)和电转化后阳性克隆检测电泳图谱(b)

Fig.5 pPink-HC-fer plasmid of positive clones and the identification result (a) and plasmid of positive clones by electroporation (b)

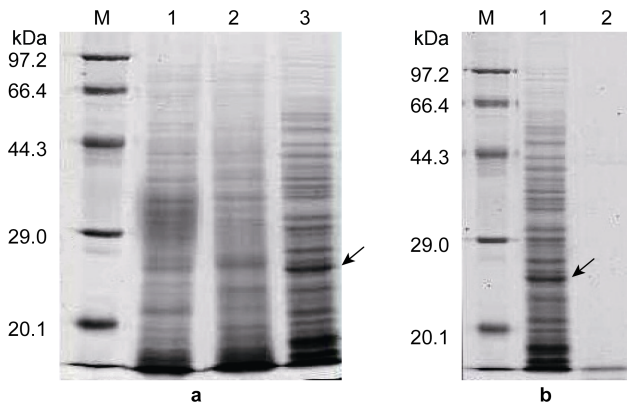


图6 pPink-HC-fer 重组蛋白的表达

Fig.6 Expression of pPink-HC-fer recombinant protein in *E. coli* BL21

a: M. 蛋白质分子量标准(低); 1. pPink-HC 空载; 2. pPink-HC-fer 未诱导; 3. pPink-HC-fer 诱导过夜。b: M. 蛋白质分子量标准(低); 1. pPink-HC-fer 诱导沉淀; 2. pPink-HC-fer 诱导上清

高分子生物学技术, 以酵母双杂交技术为基础构建的 cDNA 文库称为酵母双杂交文库(鹿连明等, 2008)。cDNA 文库构建大致经过分离总 RNA, 纯化

mRNA, 反转录成 cDNA, 然后与两端带有限制性酶切位点的人工接头相连接, 并将其插入到载体中, 转染酵母菌, 得到 cDNA 文库。因 cDNA 文库构建是以细胞中的 mRNA 为原始材料的, RNA 的纯度和完整性决定着 cDNA 文库的构建质量即序列信息的完整性。由于环境中到处都是 RNase, 且 RNase 极其稳定, 导致 RNA 易被降解, 所以要得到高质量的 mRNA, 必须在操作过程中最大限度的抑制 RNase 的活性(张荷等, 2011), 过程要特别小心, 所有用于 RNA 操作的容器、器皿都应该用 0.1% 的 DEPC 过夜处理再高温灭菌, 整个实验过程, 动作要迅速, 时间尽量缩短。所有溶液都要用 DEPC-H<sub>2</sub>O 配制(孙银行等, 2011)。本文所提取的 RNA 28S 和 18S 两条带清晰, 其中 28S 和 18S 的亮度比接近 2:1。

另外, 在 cDNA 的合成过程中, 控制 PCR 的循环次数对于 cDNA 的合成大小以及基因在文库中拷贝数分布很重要, 适当的循环次数可以防止低拷贝数的基因丢失, 同时也可以防止高拷贝数的基因过分放大, 实验中应严格按照 RNA 起始量, 合理安排 PCR 循环数(方玉楷等, 2005)。cDNA 文库的质量主要反映在文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面, 文库的代表性可用库容量来衡量。本研究构建的可口革囊星虫酵母双杂交 cDNA 文库, 库容量为  $6.09 \times 10^6$  CFU。重组 cDNA 片段的完整性是反映 cDNA 文库质量的另一个重要因素, 本研究采用了 CloneMinerIIcDNA 文库构建试剂盒, 其中的高转录活性 SuperScript III RT 酶确保了 mRNA 高精度的转录, 重组率 100%, 平均插入片段长度 >1kb。

虽然可口革囊星虫铁结合蛋白的大肠杆菌原核表达技术已十分成熟, 且能在较短的时间内获得表达产物, 所需的成本相对较低; 但目的蛋白常以包涵体形式表达, 产物复性困难, 原核表达系统翻译后加工修饰体系不完善, 表达产物的生物活性较低。真核系统具有翻译后的加工修饰体系, 表达的外源蛋白更接近于天然蛋白质, 其安全性也较好。此外, 酵母属真核的单细胞生物, 基因组仅为大肠杆菌的 4 倍, 但它却可以像原核细胞一样进行实验操作。用酵母菌作为受体菌克隆真核基因比大肠杆菌有许多优点。因此, 酵母菌是遗传工程中用于表达真核细胞基因较理想的受体细胞, 利用真核表达系统来表达目的蛋白也越来越受到重视。

本研究成功构建了可口革囊星虫的酵母双杂交文库, 为酵母双杂交技术研究蛋白质相互作用提供

了依据,为进一步研究可口革囊星虫提供了很好的条件;此外成功构建了铁蛋白的真核表达系统,表达出了20kDa的铁结合蛋白,为研究铁结合蛋白在环境治理和海洋养殖方面的应用奠定了基础。

### 参 考 文 献

- 王群力,孔波,黄河清,2004.铁蛋白纳米蛋白壳结构与功能研究新进展.化学进展,16(4):516—519
- 牛荣丽,熊亚楠,吕佳美悦,2011.可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)纤溶酶PFE的分离纯化.中国海洋药物,30(6):31—35
- 方玉楷,许丽艳,麦瑞琴,2005.酵母双杂交技术的影响因素及其实验策略.中国实验诊断学,9(1):70—74
- 孙银行,潘俊敏,2011.SMART技术构建衣藻细胞的酵母双杂交文库.生物技术通报,9:187—192
- 纪其雄,丁理发,苏秀榕等,2007.可口革囊星虫体液细胞组成及营养成分研究.水产科学,26(7):387—389
- 杜莉利,李太武,苏秀榕等,2008.可口革囊星虫(*Phascolosoma esculenta*)铁结合蛋白基因的研究.海洋与湖沼,39(3):252—256
- 李懿,李太武,苏秀榕,2008. $Cd^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $As^{3+}$ 对可口革囊星虫的急性毒性试验.水产科学,26(2):71—74
- 李德伟,孙艳红,谭敏等,2008.一种新兴的高蛋白海产品——可口革囊星虫.水产科技情报,35(4):174—176
- 张荷,毛君婷,杨颖等,2011.鸭肠炎病毒感染鸭肝酵母双杂交cDNA文库的构建.中国兽医科学,41(5):470—473
- 陈丽萍,侯付景,张迪骏等,2013.宁波沿海陆源排污口假单胞菌属(*Pseudomonas*)分布特点.海洋与湖沼,44(4):927—930
- 周化斌,张永普,吴洪喜等,2006.可口革囊星虫的营养成分分析与评价.海洋湖沼通报,2:62—68
- 贺静静,李晔,李太武等,2009.泥蚶(*Tegillarca granosa*)cDNA文库的构建.海洋与湖沼,40(3):289—295
- 秦玉明,苏秀榕,李晔等,2010.缢蛏(*Sinonovacula constricta*)cDNA文库的构建.海洋与湖沼,41(1):54—60
- 鹿连明,秦梅玲,牛晓庆等,2008.两个水稻品种(系)酵母双杂交cDNA文库的构建和比较分析.激光生物学报,17(5):656—662
- 曾海洋,竺健全,丁理法,2006.重金属镉和锌对可口革囊星虫的毒性实验.水利渔业,26(3):96—98
- Li C H, Li Z, Li Y *et al*, 2012. A ferritin from *Dendrorhynchus zhejiangensis* with heavy metals detoxification activity. PloS One, 7(12): e51428
- Su X R, Du L L, Li Y *et al*, 2009. Production of recombinant protein and polyclonal mouse antiserum for ferritin from *Sipuncula Phascolosoma esculenta*. Fish & Shellfish Immunology, 27(3): 466—468
- Wang M Q, Su X R, Li Y *et al*, 2010. Cloning and expression of the Mn-SOD gene from *Phascolosoma esculenta*. Fish & Shellfish Immunology, 29(5): 759—764

## CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARY BY YEAST TWO-HYBRID AND RECOMBINANT EUKARYOTIC EXPRESSION PLASMID OF *PHASCOLOSOMA ESCULENTA*

ZHANG Yun-Yun<sup>1</sup>, ZHOU Jun<sup>1</sup>, LI Ye<sup>1</sup>, ZHANG Chun-Dan<sup>1</sup>, CAI Jiang-Jia<sup>1</sup>,  
CHEN Li-Ping<sup>1</sup>, LI Tai-Wu<sup>2</sup>, SU Xiu-Rong<sup>1</sup>

(1. School of Marine Science, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo City College of Vocational Technology, Ningbo, 315100)

**Abstract** We constructed yeast two-hybrid library of *Phascolosoma esculenta*, containing  $6.09 \times 10^6$  independent clones. The rate of recombination was 100% and the average size of inserts was larger than 1000bp. 200 clones were sequenced. The sequencing results show that there were 1 control plasmid and 67 unknown kinds of genes in total. Among all the 132 known genes, the genes related to mitochondrial protein accounted for 29.54%, hemerythrin 15.9%, ribosomal protein 10.6%, ferritin 8.3%, actin 6.1% and other genes 29.56%, including 5-amino levulinate synthase, bleomycin hydrolase-like, fibrinolytic protein, glutamine synthetase, heat shock protein 70, 90, nonspecific alkaline phosphatase-like, lipase, metalloprotein, thioredoxin, protein phosphatase, troponin C and ubiquitin. Based on the ferritin genes of *P. esculenta*, we constructed the recombinant eukaryotic expression plasmid pPink-HC-fer with primers designed by two enzyme sites *EcoR* and *Kpn*. The fragment was successfully constructed and judged by PCR and sequencing. The product was constructed successfully through identified by SDS-PAGE after transformed into yeast by electroporation. The molecular weight of the fusion protein is 23kDa.

**Key words** *Phascolosoma esculenta*; ferritin; yeast two-hybrid library; eukaryotic expression