

文蛤肠、外套膜和肝胰脏组织 cDNA 文库构建及其 ESTs 序列分析

高祥刚¹, 李云峰¹, 宋文涛^{1,2}, 王健^{1,2}, 傅立元^{1,2}, 刘卫东¹, 鲍相渤¹, 赫崇波¹

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要: 利用 SMART cDNA 文库构建试剂盒构建了文蛤(*Meretrix meretrix*) 肠、外套膜和肝胰脏组织的 cDNA 文库。经测定原始文库滴度分别为 2.10×10^6 、 1.70×10^6 和 1.60×10^6 , 重组率高于 95%, 肠组织文库插入片段长度均大于 1 000 bp, 外套膜和肝胰脏组织文库的插入片段长度大于 1 kb 的占 87.5%, 文库质量符合标准要求。随机选取文库的 3 168 个克隆进行 5' 端测序, 获得高质量表达序列标签(Expressed Sequence Tags, ESTs) 3 029 个(肠: 1 005, 外套膜: 1 019, 肝胰脏: 1 005), 测序成功率 95.58%。经质量控制和拼接得到 1 796 个单基因簇(Unigene), 其中 306 个叠联群(Contigs), 1 490 个单一序列(Singletons)。通过 Blastx 搜索比对、查询和注释分析, 共得到已知基因 696 个(肠: 216, 外套膜: 235 个; 肝胰脏: 245 个), 占总数 38.75%。在 1 796 个单基因簇(Unigene) 发现微卫星序列 55 条, 这些存在微卫星位点的序列占整个 ESTs 数据库的 3.1%。[中国水产科学, 2010, 17(2): 344-350]

关键词: 文蛤; cDNA 文库; 表达序列标签; 微卫星标记

中图分类号: S959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0344-07

文蛤(*Meretrix meretrix*) 在中国是一种资源丰富的天然滩涂贝类, 也是重要的海水增养殖优良品种, 并且是主要的出口鲜活水产品之一。伴随着养殖规模的逐年扩大, 影响产业发展的瓶颈问题不断出现, 其中养殖病害频发^[1]、种质下降^[2]等问题已经引起业内诸多学者的关注。目前, 文蛤的研究大多是关于常规育种、养殖及遗传多样性分析^[3-4]等方面, 关于其功能基因方面的研究鲜有报道。

自 20 世纪 70 年代成功构建了第一个 cDNA 文库以来, 构建 cDNA 文库已成为研究功能基因的基本手段之一。通过构建 cDNA 文库, 进行表达序列标签(EST) 分析, 利用不断扩大的公共数据库信息, 对其功能进行推断^[5], 进行新基因的鉴定已经得到广泛的应用。针对文蛤产业发展存在的制约因素, 本研究采用 SMART 技术构建文蛤 cDNA 文库, 旨

在利用所获得的文蛤, 建立全长 cDNA 的文库, 不仅可以保存文蛤相关的遗传信息, 也为进一步克隆文蛤生长、免疫和抗逆等相关基因奠定基础, 同时还通过构建文库筛选用于构建遗传连锁图谱的遗传标记, 如 EST 微卫星序列, 为文蛤种群遗传多态性、分子辅助选择育种和遗传图谱构建等提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用的样品是 2~3 龄野生文蛤, 壳长 4.5~5.5 cm, 活体质量 27.1~39.7 g, 于 2008 年 10 月采自辽宁省盘山县双台子河口滩涂。将文蛤于水族箱中暂养 2 d 后, 选取 10 个文蛤, 分别取其肠、外套膜和肝胰脏组织, 各组织分别混合后放入液氮中保存。

收稿日期: 2009-07-18; 修订日期: 2009-09-22.

基金项目: 辽宁省科学技术计划重大、重点项目(2008203001); 辽宁省海洋与渔业科研计划项目(200801); 国家海洋公益性行业科技专项(200805037).

作者简介: 高祥刚(1980-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 水产生物技术. E-mail: xiangganggao@163.com

通讯作者: 赫崇波(1961-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 水产分子遗传学. Tel: 0411-84697003; E-mail: hechongbo@hotmail.com

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 将每种组织在液氮中充分研磨,加入适量 TaKaRa RNAsiso Reagent,按照说明书的步骤提取总 RNA。将所提取的总 RNA 进行电泳,检测总 RNA 的完整性。用 *OligotexTM-dT30<Super>* mRNA 纯化试剂盒(Takara),进行 mRNA 的分离纯化。

1.2.2 cDNA 文库的构建 根据 CreatorTM SMART cDNA 文库构建试剂盒(Clontech)说明书,以纯化后的 3 种组织的 RNApoly(A)⁺ mRNA 为模板,带有 *Sfi* I 酶切位点的 SMART IVTM Oligonucleotide 和 CDSIII/3' PCR Primer 为引物,在反转录酶作用下转录合成 cDNA 第 1 链。确定最佳循环数后在 Advantage 2 PCR Kit (Clontech)作用下合成 cDNA 第 2 链。双链 cDNA 经 *Sfi* I 酶切及片段纯化后,连接到 pDNR-LIB 载体上。将含有 cDNA 的质粒载体转化感受态细胞 DH10B。检测文库质量合格后,向转化细胞中加入 50% 的甘油,混匀后放入冰箱 -80℃ 保存。

1.2.3 cDNA 文库的鉴定 库容量测定:取 1 mL 转化细胞的 LB 培养液,37℃ 预热 1 h,取 1 μL 转化细胞将其分别稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍后,各取 10 μL 稀释过的菌液涂布到含有 30 μg/mL 氯霉素的 LB 平板上,37℃ 培养过夜,计算每个平板上的克隆数。

库容量 = 菌落数 × 稀释倍数 × 转化细胞总数体积 / 涂布菌体体积

插入片段检测:用灭菌处理过的牙签在 30 μg/mL 的氯霉素 LB 平板上随意挑取 50 个克隆至 1 mL LB 液体培养基中,37℃ 培养过夜,用 M13 引物 PCR 扩增后凝胶电泳检测 PCR 结果。

重组率计算:对随机挑取的 50 个单克隆 PCR 扩增后,计算重组克隆和非重组克隆的比值,确定重组率。

1.2.4 ESTs 序列测定和初步分析 使用 Cross-match 软件去掉 EST 中的低质量序列、载体序列、重复序列等^[6-7],使用 Phrap 序列拼接软件将测序得到的 EST 拼接成重叠群并使用 Consed 软件做人工检查和校正^[8-9],用 BlastX 程序将 EST 序列与 NCBI 的非冗余蛋白序列数据库(NR)进行比对。利用 Blast2GO 软件对所有 ESTs 进行基因功能分析及

序列长度、*E* 值的统计,并对单基因簇(Unigene)按分子功能进行分类^[10]。利用网络工具(<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>)和 SSR Hunter 软件,筛选多态性微卫星标记。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

高质量总 RNA 的提取以及 mRNA 的纯化是 cDNA 文库构建成败的关键。文蛤 3 种组织总 RNA 提取液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,从阴极到阳极依次呈现 3 条带,分别为 28S、18S 和 5S rRNA。这 3 个条带清晰,表明提取的总 RNA 完整,所提 RNA 完整性好,未发生降解(图略)。

2.2 cDNA 的合成

合成的双链 cDNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示(图略):cDNA 大小分布在 200 ~ 4 000 bp 之间,大部分集中在 500 ~ 1 500 bp 之间,符合 cDNA 合成的分布规律,证明 cDNA 已成功合成。

2.3 cDNA 文库的鉴定

取 1 μL 细胞转化液稀释一定倍数后,各取 10 μL 稀释过的菌液涂布,37℃ 培养过夜后,计算克隆总数,测得肠、外套膜和肝胰脏 3 种组织的 cDNA 文库的原始库容分别为 2.10×10^6 、 1.70×10^6 和 1.60×10^6 。随机选取单克隆菌落以 M13 引物进行扩增,根据 PCR 扩增结果计算得到重组率超过 95%,且插入片段大部分均大于 500 bp,肠组织文库插入片段长度均大于 1 000 bp,外套膜和肝胰脏组织文库的插入片段长度大于 1 kb 占 87.5%(图略)。

2.4 ESTs 测序及初步分析

2.4.1 ESTs 测序、拼接和注释 随机选取文库的 3 168 个克隆进行 5' 端测序,获得高质量 EST 序列 3 029 个(肠 1 005 个,外套膜 1 019 个,肝胰脏 1 005 个),测序成功率 95.58%。经质量控制和拼接得到 1 796 个单基因簇(Unigene),其中 306 个叠联群(Contigs),1 490 个单一序列(Singletons)。通过 Blastx 搜索比对、查询和注释分析,共得到已知基因 696 个(肠 216 个,外套膜 235 个,肝胰脏 245 个)占总数 38.75%,详见表 1。

表 1 文蛤各组织 cDNA 文库 ESTs 统计
Tab. 1 Summary of ESTs of cDNA in different tissues of *M. meretrix*

描述项 Descriptive category	肠 Intestine	外套膜 Mantle	肝胰脏 Hepatopancreas
ESTs 总数 Total number of ESTs	1056	1056	1056
高质量 EST 数 High-quality ESTs	1005	1019	1005
叠联群 Contigs	79	116	111
重叠群包含的 ESTs 数目 ESTs covered by contigs	444	456	425
单一序列/% Singletons	501	454	535
推测功能的 ESTs Hypothetical genes	216	235	245
单基因簇 Unique sequences	580	570	646
平均大小/bp Average size	746	705	750

2.4.2 获得基因注释 ESTs 功能分类 通过 Gene Ontology 法分类,对获得注释的 696 个 ESTs 按功能进行分类(表 2),发现仅有预测功能方面基因数量最多(General function prediction only)为 119 个,翻译后修饰、蛋白质折叠及伴侣蛋白(Posttranslational modification, protein turnover, chaperones)及能量产生和转换(Energy production and conversion)相关基因次之,分别为 103 个和 91 个。防御机理(Defense mechanisms)、RNA 加工修饰(RNA processing and modification)基因和细胞运动及分泌(Cell motility and secretion)基因数量较少,分别为 4 个、3 个、3 个。3 个文库之间功能基因的种类略有不同,其中细胞运动及分泌(Cell motility and secretion)基因只存在于外套膜组织中, RNA 加工修饰(RNA processing and modification)基因在肝胰脏中没有发现。所得到的单基因序列已经提交到 GenBank ESTs 库中,登录号为 GR210953-GR212026 和 GR902395-GR903116。

3 个文库之间功能基因的数量也有一定差异(图 1),有 187 个基因是在 3 个文库中共有的; 90 个基因是在肠和外套膜 2 个文库中共有的; 80 个基因是在肠和肝胰脏 2 个文库中共有的; 88 个基因是在肝胰脏和外套膜 2 个文库中共有的; 还有大量的组

织特异性的基因单独分布在肠、外套膜和肝胰脏这 3 个文库中(分别含有 223 个、205 个和 291 个)。

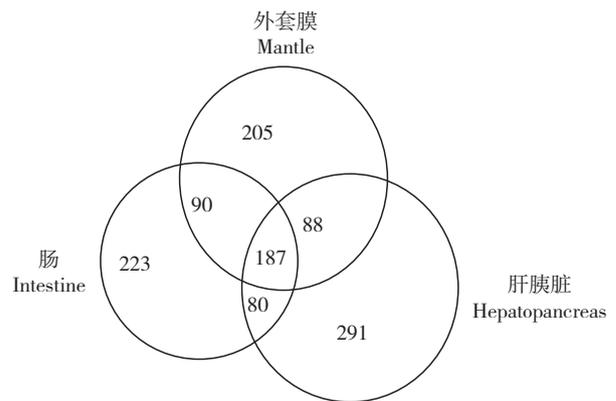


图 1 文蛤肠、外套膜和肝胰脏中基因在 3 个文库中的分布
Fig. 1 Diagram showing the overlap of significant hits among the three libraries

2.4.3 微卫星序列的筛选 通过构建文蛤的 cDNA 文库和进行较大规模的 EST 测序,筛选多态性微卫星标记,经过人工筛选,在 1 769 个 Unigene 中发现微卫星序列 55 条,设计引物 22 对(表 3),(筛选标准是: 7 次以上重复的双碱基序列或 5 次以上重复的三、四碱基重复序列)。这些存在微卫星位点的序列占整个 ESTs 数据库的 3.1%。证明在文蛤中存在着 EST 来源的微卫星序列。

表 2 GO 分类预测的文蛤各组织 Unigene 功能和数量

Tab. 2 Summary statistics of function and number of unigene in different tissues of *M. meretrix* by GO (Gene Ontology) analysis

推定功能 Putative function	肠 Intestine	外套膜 Mantle	肝胰脏 Hepatopancreas
氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	10	9	10
糖类转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	4	17	20
细胞分裂与染色体分离 Cell division and chromosome partitioning	10	2	6
细胞膜包膜合成, 外膜 Cell envelope biogenesis, outer membrane	4	3	2
细胞运动与分泌 Cell motility and secretion	0	3	0
染色质结构和动力学 Chromatin structure and dynamics	2	1	4
辅酶代谢 Coenzyme metabolism	3	2	6
细胞骨架 Cytoskeleton	28	12	30
防御机制 Defense mechanisms	2	1	1
DNA 复制、重组与修复 DNA replication, recombination and repair	3	1	2
能量产生与转化 Energy production and conversion	23	27	41
功能未知 Function unknown	6	7	6
仅有预测功能 General function prediction only	35	43	41
无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	5	12	7
细胞内转运和内分泌 Intracellular trafficking and secretion	1	5	3
脂代谢 Lipid metabolism	3	11	5
核苷转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	3	1	3
转录后修饰、蛋白质折叠、伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	39	39	25
RNA 加工修饰 RNA processing and modification	2	1	0
次级代谢产物生物合成、转运及分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	3	10	2
信号传导 Signal transduction mechanisms	11	14	14
转录 Transcription	3	1	6
翻译、核糖体结构和生物发育 Translation, ribosomal structure and biogenesis	16	13	11

表3 部分微卫星引物序列及其参数
Tab.3 Characters and sequences of some screened microsatellite primer

单基因簇 Unisequence	重复单元 Repeat motif	片段大小/bp Size	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
L10_CDNA_01_41.T7_A06	(TA) ₇ (TG) ₂	162	F: gtgatactggcattactag R: aattcaattctctctggc
L10_CDNA_02_03.T7_C01	(TGT) ₅	170	F: actcgcgtgttagatcat R: tcccagtgtagaagtcag
L10_CDNA_02_35.T7_C05	(GAT) ₅	220	F: ggagatgttacctggaate R: gatgatcaaagtgcctagt
L10_CDNA_02_92.T7_D12	(GTT) ₅	182	F: taatagagaaatggcagctc R: aagtactccaacttacctct
L10_CDNA_03_21.T7_E03	(ACA) ₅	157	F: tgtgctcggctgtctcata R: atggactggtgtcctctga
L10_CDNA_04_31.T7_G04	(TTG) ₇	164	F: gcaagagttaaagcaggatg R: ctttggttccagaggctat
L10_CDNA_04_50.T7_B07	(GT) ₄ GC(GT) ₁₀	201	F: taggcacatagtgttacce R: ctggcacaagactcattgtc
L10_CDNA_07_23.T7_G03	(AAC) ₅	209	F: aatgcaaacctggactcag R: ctggttattgttggtagt
L10_CDNA_08_04.T7_D01	(AT) ₁₅	206	F: gtgttattgacattctagge R: acaatacaactctgcct
L10_Contig85	(TGG) ₈	225	F: gtagtggttcgagaattcac R: gaagaaagcagacaatgc
L11_CDNA_01_09.T7_A02	(TAG) ₃ (TGA) ₅	149	F: ccagaaccaattgtcgtg R: agatgacctttgacagatc
L11_CDNA_01_78.T7_F10	(TTC) ₁₂	425	F: cactgattaggatcgaggtagc R: caatgcaaggtgcatcgag
L11_CDNA_03_49.T7_A07	(GAA) ₆	165	F: cgaccaagaattgtctgct R: tgccttactatcagctgtg
L11_CDNA_05_08.T7_H01	(GT) ₇	169	F: cattggtgaaagatgacct R: gttctaaagaatcgcgga
L11_CDNA_10_47.T7_G06	(TGA) ₅	178	F: tagtgttggtggtcaa R: ataggctttgatgcccga
L11_CDNA_10_55.T7_G071	(CAA) ₅	103	F: ggaacggaatgagagttt R: ccttctaaactggaacte
L11_CDNA_11_46.T7_F06	(CAA) ₅	209	F: gaccatcgactcaacagc R: tggcattgtaaccggttatgc
L11-Contig76	(GAC) ₂ (GAT) ₅	200	F: tgaagacagattgacgatg R: accaatcatttctatcgcg
L11-Contig98	(AG) ₇	201	F: ggagtagttgtgtctttga R: cacaactcaccataaac
L11-Contig100	(GTCC) ₅	216	F: gcatacacatatcaagaactg R: agttgcgttcacaagatt

3 讨论

辽东湾是中国北方文蛤的重要自然产区之一,是世界最大的天然文蛤繁殖地,曾一直栖息着大量的文蛤,并且成为国内最大文蛤天然苗种场^[11]。但是,由于病害、过度采捕和环境生态等原因,导致滩涂文蛤大量死亡,滩涂文蛤资源蕴藏量急剧下降,天然苗种场的附苗量随之减少,严重影响滩涂文蛤产业健康持续发展^[12]。本实验材料采自盘山县双台子河口滩涂,具有代表性。

SMART cDNA 文库构建试剂盒是利用逆转录酶内源的末端转移酶活性,不需要额外的 cDNA 抽提纯化,只需要少至 25 ng 的 mRNA 或 50 ng 的总 RNA 就可以得到高质量、高产量的 cDNA 库,最重要的是得到的 cDNA 能够代表原有样品中的 mRNA 的丰度,可以应用于直接扩增基因、构建 cDNA 文库、已知序列扩增全长 cDNA (RACE) 等。

RNA 的质量最终决定了 cDNA 文库的质量,因此成功构建一个 cDNA 文库,高质量和高纯度 RNA 的获得是一个至关重要的先决条件。RNA 的提取

方法很多,例如异硫氰酸肌-酚法、盐酸肌-有机溶剂法等。在提取 RNA 的过程中最关键的一点是必须抑制内源和外源的 RNA 酶的活力。因为 RNA 酶具有耐高温,不易变性,活性不易被抑制的特点,很难除去。本研究采用 TRIZOL 试剂盒,使用 RNAiso Reagent (TaKaRa) 试剂,在液氮中充分研磨文蛤组织,按照说明书的步骤提取总 RNA。TRIZOL 试剂是强烈的蛋白质变性剂,在溶解细胞组分的同时还具有强烈的抑制 RNase 的作用。

本实验构建了文蛤肠、外套膜和肝胰脏全长 cDNA 文库。库容量、重组率、插入片段检测均表明所建 cDNA 文库的质量符合要求。通过 Blastx 搜索比对、查询和注释分析,只得到已知基因 696 个,仅占总数 38.75%,已知基因比例较低。究其原因可能是由于贝类等无脊椎动物的 cDNA 文库构建较少,已知功能基因少,而且贝类与其他脊椎动物的亲缘关系较远,从而导致了 Blast 搜索的已知基因较少。

通过对随机挑选的部分克隆的测序及 ESTs 分析结果表明,单基因簇中存在大量的新基因,并且不同组织中功能基因的种类、数量存在一定差异。本研究之所以选择肠、外套膜和肝胰脏作为 cDNA 文库的构建组织,是因为这些组织中存在着大量与生长、发育、抗逆、免疫等密切相关的基因^[13-15];本研究结果发现组织特异表达的有 719 个基因,占 1796 个单基因簇的 40%。因此,构建不同组织的 cDNA 文库,是查找文蛤相关功能基因的重要途径之一。

此外,在 1796 个 Unigene 发现微卫星序列 55 条,占整个 ESTs 序列的 3.1%,证明在文蛤中存在着大量 EST 来源的微卫星序列,EST 微卫星序列的进一步验证和开发,为文蛤种群遗传多态性、分子辅助选择育种和遗传图谱构建等提供参考资料。

参考文献:

- [1] 刘连生,闫茂仓,林志华. 引起文蛤暴发性死亡病原菌的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报,2009,36(1): 71-77.
- [2] 陈大鹏,沈怀舜,丁亚平,等. 文蛤、青蛤和四角蛤蜊的随机扩增多态性 DNA(RAPD)的比较分析 [J]. 海洋通报,2004,23(6): 84-87.
- [3] 张安国,李太武,苏秀榕,等. 文蛤养殖现状及展望 [J]. 水产科学,2005,24(2): 31-33.
- [4] 赫崇波,丛林林,葛陇利,等. 文蛤养殖群体和野生群体遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中国水产科学,2008,15(2): 215-221.
- [5] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome project [J]. Science,1991,252(5013): 1651-1656.
- [6] Ewing B, Hillier L, Wendl MC, et al. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment [J]. Genome Res,1998,8: 175-185.
- [7] Ewing B, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities [J]. Genome Res,1998,8: 186-194.
- [8] Gordon D, Desmarais C, Green P. Automated finishing with autofinish [J]. Genome Res,2001,11: 614-625.
- [9] Gordon D. Viewing and editing assembled sequences using Consed [M]. Current protocols in bioinformatics, New York: John Wiley & Co. 2004.
- [10] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, et al. Gene ontology: Tool for the unification of biology [J]. Nature Genetics,2000,25: 25-29.
- [11] 罗有声. 辽河口文蛤苗场特点的研究 [J]. 水产科学,1983,(4): 6-10.
- [12] 刘连生,闫茂仓,赵海泉,等. 文蛤疾病学研究进展 [J]. 水产科学,2009,28(4): 234-237.
- [13] 张学俊,屈刚,朱文漓,等. 草鱼肠道 cDNA 文库构建及部分 ESTs 分析 [J]. 水生生物学报,2007,31(2): 251-258.
- [14] 李静,张文兵,麦康森,等. 皱纹盘鲍外套膜 cDNA 表达文库的构建 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版,2008,38(5): 744-748.
- [15] 郑明刚,孙修勤,张进兴. 皱纹盘鲍肝和肾 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的初步研究 [J]. 高技术通讯,2007,17(3): 319-324.

Construction of cDNA libraries from intestine, mantle and hepatopancreas of hard clam (*Meretrix meretrix*) and ESTs analysis

GAO Xianggang¹, LI Yunfeng¹, SONG Wentao^{1,2}, WANG Jian^{1,2}, FU Liyuan^{1,2}, LIU Weidong¹, BAO Xiangbo¹, HE Chongbo¹

(1. Liaoning Ocean and Fishery Science Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China; 2. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: The cDNA libraries of intestine, mantle and hepatopancreas of hard clam (*Meretrix meretrix*) were constructed with SMART cDNA Library Construction Kit. The libraries have a high titer of 2.10×10^6 , 1.70×10^6 and 1.60×10^6 , respectively. The recombined efficiency of each cDNA library exceeded 95%. The all insert sizes of intestine library were over 1 kb, and the insert sizes over 1 kb in the mantle and hepatopancreas libraries were over 87.5%. A total of 3 168 clones of the libraries were randomly picked and sequenced from the 5' end of the cDNAs using a M13 universal primer, and 3 029 raw sequences of the ESTs were processed and then assembled into 1 796 unigene involving 306 contigs and 1 490 singletons. Blastx analysis showed that 696 unigenes (216 for intestine, 235 for mantle and 245 for hepatopancreas) (38.75%) had significant homology ($E\text{-value} \leq 10^{-5}$) to genes with known or putative functions in GenBank. The sequences containing microsatellite DNA (SSR) accounted for 3.1% of all ESTs indicating that SSR sequences were rich in the ESTs of hard clam. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2) : 344–350]

Key words: *Meretrix meretrix*; cDNA Library; expressed sequence tags; EST-SSR

Corresponding author: HE Chongbo. E-mail: hechongbo@hotmail.com