

副溶血弧菌感染 12 h 和 24 h 杂色鲍肝脏全长 cDNA 文库的构建

王艺磊¹, 张子平², 戴 军¹, 邹志华¹, 王淑红¹

(1. 集美大学 水产生物技术研究所, 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 美国密歇根州立大学 水产与野生生物系, 密歇根, 美国)

摘要:采用 RDP 试剂提取杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)不同免疫时相肝脏的总 RNA, 经 Oligotex 试剂盒纯化得到 mRNA。根据 SMART(switching mechanism at 5' end of RNA transcript)原理, 利用含 *gfiB* 酶切位点的 Oligo(dT)引物合成 cDNA 第 1 条链, 利用含 *gfiA* 酶切位点的 SMART III 寡核苷酸作为 cDNA 第 1 条链在 mRNA 5' 端延伸出去的模板, 采用 LD-PCR 引物合成双链 cDNA。双链 cDNA 用 *gfiI* 酶切和过柱分级分离后, 与 λ Triplex2 两臂进行连接, 随后进行 λ 噬菌体体外包装反应, 构建成杂色鲍不同免疫时相(12 h 和 24 h)全长 cDNA 文库。构建好的文库分别含有约 5.04×10^6 和 2.95×10^6 个重组子。插入 cDNA 长度分布在 500 bp ~ 3 kb, 说明文库具有良好的质量, 为进一步筛选、克隆杂色鲍免疫调控基因奠定了基础。

关键词: 杂色鲍; cDNA 文库; SMART; 免疫时相; 肝脏

中图分类号: Q959.212 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)03-0190-06

鲍是重要的养殖贝类。近年来, 鲍的人工养殖在我国南北沿海蓬勃发展, 产量迅速提高, 已成为我国海水养殖业的重要组成部分。与此同时, 鲍养殖场频繁发生暴发性病害, 给鲍养殖业带来了巨大的损失^[1-2]。目前提出的解决人工养殖鲍受病害威胁的方向包括^[3]: (1) 研究选择合适的免疫增强剂, 以提高贝类的抗病力; (2) 通过选择育种或转基因以构建具免疫基因的高抗病力个体或品系。这 2 个方向的发展均需预先构建坚实的鲍的分子免疫学基础, 尤其是应先行克隆鲍参与调控抗病的基因并对其功能进行分析, 因此寻找鲍的抗病基因也就成为这 2 项工作的基础。近年来, 随着贝类人工养殖的迅速发展, 贝类的细胞和体液防御机制研究引起了越来越多的关注, 取得了大量研究结果。这些结果表明, 与哺乳动物相似, 贝类对病原生物的抵御主要也是通过细胞和体液防御机制来完成的^[3-5]。虽然贝类, 特别是鲍的免疫学基础十分薄弱, 但可以肯定鲍存在可调控的细胞和体液防御机制^[3-5]。本实验选择致病细菌感染后 12 h 和 24 h 的杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)的肝脏组织样品, 抽提其总 RNA, 分离 mRNA, 用 SMART 原理^[6]构建不同免疫时相 cDNA

文库, 希望通过比较研究不同免疫时相鲍的基因表达谱, 寻找到参与鲍机体免疫调控的基因。为从基因水平上研究鲍的免疫机制奠定基础。并可为抗病鲍良种选育的分子标记, 构建抗病转基因鲍的目的基因和为研制养殖鲍免疫增强剂提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验对象 杂色鲍购自厦门大嶼和东山鲍养殖场, 于 25 ℃ 海水中暂养 2 周后用副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)注射足部肌肉, 分别在 1 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、96 h 后剪取存活个体的肝脏, 用液氮固定后于 -80 ℃ 保存待用。取酶活性变化较明显的 12 h 和 24 h 的肝脏用于构建 cDNA 文库。

1.1.2 试剂 总 RNA 抽提液 RDP 试剂由本实验室自制^[7]。Oligotex mRNA 纯化试剂盒和 PCR 纯化试剂盒购自 QIAGEN 公司, SMART™ cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司, 包装试剂盒 MaxPlax™ Lambda Packaging Extra 购自 EPICENTRE 公司。

1.1.3 引物 SMART III 寡核苷酸: AAGCACTGG-

收稿日期: 2003-10-08; 修订日期: 2004-01-15。

基金项目: 国家“863”高技术计划项目资助(2002AA629220)。

作者简介: 王艺磊(1963-), 女, 博士, 教授, 从事水产动物基因组学的研究。

通讯作者: 张子平。E-mail: zipingen@msu.edu

TATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG。CDSⅢ/3'PCR引物:ATTCTAGAGCCGAGGCGGCCGACATG-(T)₃₀N-1N(N=A,G,C,或T;N-1=A,G,或C)。λTripEx2插入子筛选引物是T7启动子引物:TAATACGACTCACTATAGG,5'测序引物:CCGAGATCTGGACGAGC。以上引物均由Invitrogen公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞总RNA的提取^[7]和mRNA的分离

按照自制的RDP试剂及本实验室常规使用的方法,提取杂色鲍肝脏的总RNA。挑取无水乙醇保存的12h和24h的4只鲍肝脏的总RNA,干燥后加水溶解,测定OD₂₆₀,取等量分别混合,采用Oligotex试剂盒从总RNA中分离纯化mRNA。

1.2.2 cDNA的合成 cDNA第一条链的合成:取0.5 μg纯化的mRNA,在5 μL反应体积中加入1 μL浓度为10 μmol/L的CDSⅢ/3'PCR引物和1 μL浓度为10 μmol/L的SMARTⅢ寡核苷酸,置MJ-PCR仪上72℃变性2 min,冷却后,加入浓度分别为200 U/μL SuperscriptTMⅡ逆转录酶,10 mmol/L dNTP混合液,20 mmol/L DTT各1 μL及5×第1条链合成缓冲液2 μL,使总体积达10 μL,置于MJ PCR仪上42℃反应1 h,逆转录合成cDNA第1条链。cDNA第2条链的合成:取cDNA第1条链反应产物2 μL,加入浓度为10 μmol/L的CDSⅢ/3'PCR引物和5'PCR引物各2 μL,再加入50×Advantage2聚合酶混合液和50×dNTP混合液各2 μL,10×第2链合成缓冲液10 μL,加无RNA酶的水使反应体积达100 μL。置于MJ-PCR仪上采用LD-PCR(长距离PCR)技术扩增双链cDNA。反应参数为:95℃变性20 s之后,95℃变性5 s,68℃复性延伸6 min,进行22个循环。

1.2.3 cDNA的纯化、消化和连接反应 使用PCR纯化试剂盒纯化第2条链反应产物,用洗脱液洗脱后测定OD₂₆₀,计算浓度,取2 μg双链cDNA加水补足至89 μL,加入10 μL *sf*Ⅱ(20 U/μL),1 μL的100×BSA,总反应体积达100 μL,于50℃酶切2 h。使用CHROMA SPIN-400柱对酶切产物进行片段分级分离,共收集16管,每管收集1滴。各取3 μL于1.1%琼脂糖凝胶电泳10~15 min,UV成像系统拍照,取片段大小符合建库要求的收集产物,混合,加入1/10体积的3 mol/L醋酸钠(pH 4.8),1.3 μL糖原(20 mg/mL)和2.5倍体积95%乙醇,颠倒混

匀,置-20℃1 h,14 000 r/min离心20 min完全沉淀cDNA,弃上清液,室温晾干,用7 μL水溶解。cDNA与λTripEx2载体连接采用2.5:1(体积比)的反应比例,反应体积为5 μL,置MJ-PCR仪上16℃反应过夜。

1.2.4 λ噬菌体体外包装反应 上述连接产物采用MaxPlaxTM Lambda Packaging Extracts包装系统包装。将包装试剂盒从-80℃取出,手握使其融化,于冰上操作,先取一半包装蛋白(25 μL)与连接产物混匀,置37℃水浴90 min,再将另外一半包装蛋白加入,置37℃水浴继续反应90 min。后加入500 μL的噬菌体稀释缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3,100 mmol/L NaCl,10 mmol/L MgCl₂),轻轻混匀,再加入20 μL氯仿,储存于4℃冰箱。

1.2.5 cDNA文库的容量与重组率测定、扩增及质量鉴定 用枪头从培养XL1-Blue细菌的平板上挑取单克隆菌落,置于装有15 mL内含10 mmol/L MgSO₄和0.2%麦芽糖的无菌LB肉汤的培养瓶中,置于37℃摇床过夜培养,离心收集细菌,用10 mmol/L MgSO₄重悬细菌。取包装产物2 μL,用噬菌体稀释缓冲液作1/10、1/20、1/40、1/80梯度稀释后,各取2 μL与400 μL过夜培养的10 mmol/L MgSO₄重悬的细菌混匀,于37℃孵育10~15 min,使包装好的噬菌体侵染细菌。随后与50℃左右的软上层琼脂混匀,铺LB平板,每个梯度铺两板,计算每板噬菌斑个数,按照公式:滴度(pfu/mL)=噬菌斑个数×稀释倍数×10³计算未扩增文库的滴度,滴度乘于包装产物总体积约550 μL,得文库容量。随机挑取每个文库48个单克隆噬菌斑,用T7和5'测序引物扩增,根据扩增产物有无和大小,判断文库的重组率与质量。

1.2.6 未扩增cDNA文库的保存 包装好的噬菌体文库加入DMSO至终浓度7%,分装于1.5 mL的离心管中,于-80℃保存。

2 结果

2.1 鲍肝脏总RNA的抽提与mRNA的纯化

RNA极易降解,总RNA的质量直接关系到文库的质量,从电泳结果可以看出,用自制的RDP试剂抽提的总RNA,18 s rRNA,28 s rRNA条带清晰,其OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.9~2.0,纯度高(图1)。mRNA分子量分布适中(图2),18 s rRNA和28 s rRNA已大部分除去,OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.7~1.96,纯

度较高,这些都为构建全长 cDNA 文库提供了质量保证。

2.2 cDNA 的合成

采用 SMART 技术,用 SuperscriptTM II 逆转录酶将 mRNA 逆转录成单链 cDNA 后采用 LD-PCR 合成双链 cDNA,琼脂糖电泳分析可见片段大小多集中在 500 bp 以上,且长度分布均匀(图 3),满足构建 cDNA 文库的要求。

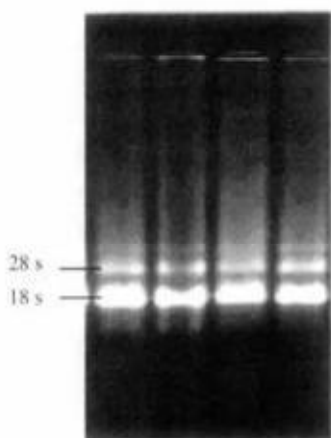


图1 肝脏总 RNA

Fig.1 Total RNA from abalone liver

2.3 cDNA 分级分离柱的纯化分析

在 cDNA 的分级分离过程中,从第 4 管开始出现产物,500 bp 以下的片段开始在第 8 管出现,为了保证所得片段均为全长,只混合 4~6 管产物,以确保文库的质量(图 4)。

2.4 未扩增 cDNA 文库的滴度

得到双链 cDNA 后,连接反应与包装反应的好坏就决定了文库的质量。本研究载体与 cDNA 体积比为 1:2.5,产生重组体较多,包装后重组率约为 85%,且重组片段较大。本实验采用的包装试剂盒 MaxPlaxTM Lambda Packaging Extracts,常温下操作即可,且分 2 次加入包装蛋白,从而保证得到较高的包装效率。未扩增文库的滴度分别达到了 9.01×10^6 pfu/mL 和 5.3×10^6 pfu/mL。体现文库质量(即文库包含的重组 cDNA 分子应能完整的反映出来源细胞中表达的全部信息)的最重要指标可通过一量化指标即文库容量来衡量^[8],满足最低要求的 cDNA 文库的库容量可用下列公式计算: $N = \ln(1-P)/\ln(1-n/T)$, N 为文库中以 P 概率出现细胞中任何一种 mRNA 序列理论上应具有的最少重组子克隆数,

P 为文库中包含任何一种 mRNA 序列信息的概率,通常取 99%, n 为细胞中最稀少的 mRNA 序列的拷贝数, T 为细胞中表达出所有 mRNA 的总拷贝数^[8]。因此,根据真核生物中 mRNA 的表达情况^[8],可得构建未扩增文库理论上应具有的最少单克隆数约为 2.9×10^5 ,但在实验过程中考虑到其他因素干扰,一般应有 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 的克隆数文库才够完整。本实验构建的文库库容分别达到 5.04×10^6 和 2.95×10^6 ,满足构建文库的要求,包含大部分稀有 mRNA 的克隆几率比较高。

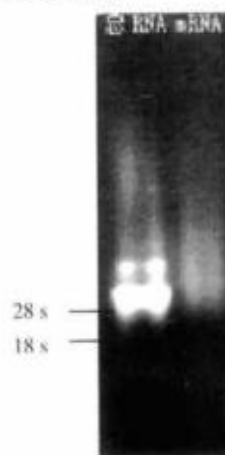


图2 肝脏总 RNA 和 mRNA

Fig.2 Total RNA and mRNA of liver

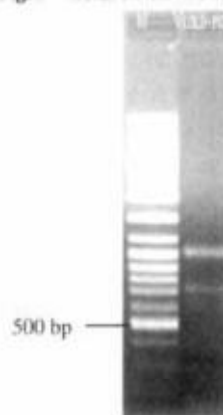


图3 肝脏双链 cDNA

Fig.3 ds cDNA from liver

2.5 cDNA 插入片段长度分析

随机各挑取的 48 个克隆,以载体特异的 5'测序引物和 T7 启动子引物进行 PCR 扩增,插入片段大小为 500 bp~3 kb,片段大,说明文库具有较好的质量(图 5)。

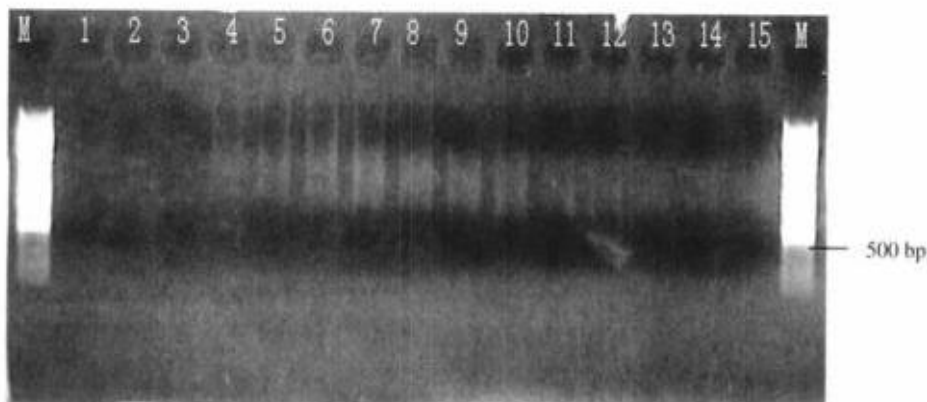
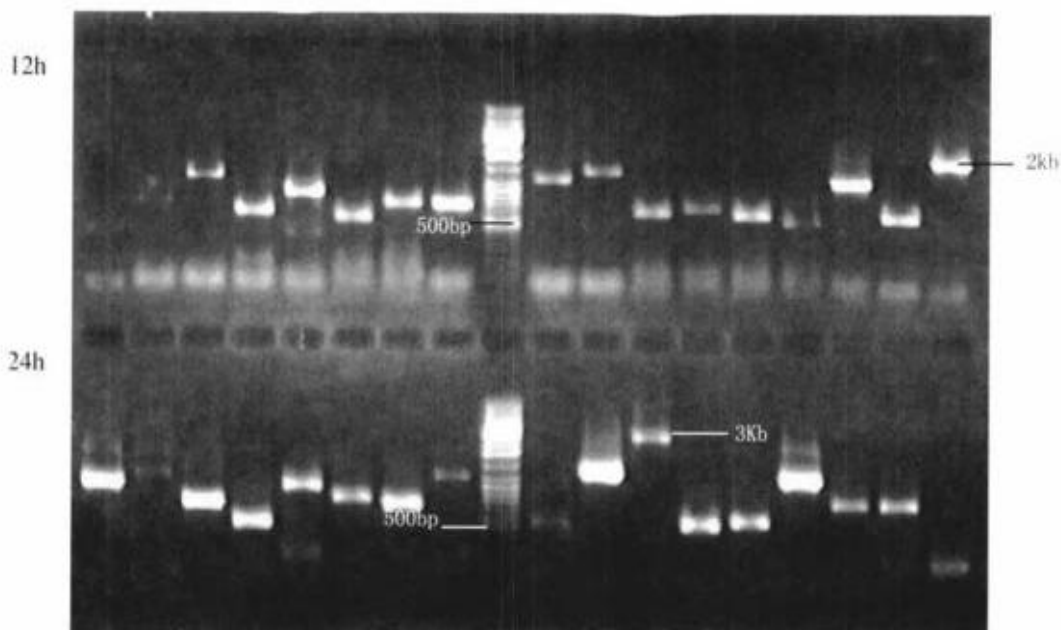
图4 *Sfi*I 酶切 24 h 后双链 cDNA 产物的分级分离Fig. 4 Size fractionation of ds cDNA after *Sfi*I digestion

图5 随机挑取两个时相 cDNA 文库中单克隆 PCR 产物大小在 500 bp ~ 3 kb

Fig. 5 Length of cDNA inserts from two cDNA libraries, ranging from 500 bp to 3 kb

3 讨论

3.1 研究目的与意义

生物体在不同生长发育阶段以及生理状态下,表达不同的蛋白质执行生理功能。人工感染副溶血弧菌后的鲍,其机体内必将产生一些功能蛋白以抵抗病原体的侵害。贝类对病原生物的抵御主要也通过细胞和体液防御机制来完成的。其体液防御因子包括有:溶酶体酶(酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、氨肽

酶等)、凝集素与外源凝集素、溶血素^[3-5],这种在蛋白水平的变化必将体现在相应的 RNA 变化之中。而 cDNA 文库在研究具体某种生理或病理状态下基因组的表达状态以及表达基因的功能鉴定方面具有特殊的优势,通过比较不同免疫状态下肝脏细胞的基因表达图谱,有望得到与机体免疫相关的功能基因。本研究正是基于此,选择 12 h 和 24 h 不同免疫时相的鲍肝脏,提取其总 RNA,经分离纯化、逆转录及重组克隆后构建 cDNA 文库,拟从 RNA 水平分析

鲍的分子免疫机制。与模式生物和人不同,鲍免疫机制方面的研究相对比较贫乏^[3],本实验采用 SMART 方法构建鲍不同免疫时相的全长 cDNA 文库,具有重要的意义。构建成功的鲍全长 cDNA 文库中,大部分都将具有保守的蛋白编码区,其所包含的免疫相关基因则可为研究其他重要水产动物提供比较对象。

3.2 建库方法

构建 cDNA 的大致步骤包括细胞总 RNA 的分离, mRNA 的分离, cDNA 第 1 链的合成, cDNA 第 2 链的合成, cDNAs 的克隆^[8-11]。如果要构建一个表征性强的全长 cDNA 文库,则要求每一步骤都必须保证核酸的完整性。从细胞中提取 RNA 和提取 DNA 的方法基本相同,但是由于 RNA 酶不易失活,分离 RNA 时,抑制 RNA 酶的活性就显得特别重要,为了获得高质量的 mRNA 必须使用 RNA 酶的抑制剂或采用破碎细胞和灭活 RNA 酶同步进行的方法^[10]。本研究采用的自制 RDP 试剂,含有强烈变性剂异硫氰酸胍,最大限度地降低了细胞破碎过程中所释放的 RNA 酶的活性。在纯化 mRNA 时,根据真核生物 mRNA 3' 端有 PolyA 尾的特征,通过 Oligo(dT)-纤维素颗粒亲和吸附^[10]分离得到 mRNA。获得全长 cDNA 是构建全长文库的关键,因为只有长片段的 cDNA,其携带的编码信息才会完全,这对于研究非模式生物鲍来说是非常重要的。已知的鲍核酸信息很少,很难根据获得的短片段 cDNA 序列,来判断其属于哪一个基因。获得全长 cDNA 文库的方法目前主要有根据 SMART 技术构建的 RACE cDNA 文库^[6]及根据 mRNA 5' 端帽子结构设计的帽捕捉法构建的文库^[12]等。如果必须高效克隆真核 mRNA 5' 端序列,一般都必须在 cDNA 第 1 条链合成后用末端转移酶在游离的 3' 羟基后加上 Oligo(dC) 尾。本实验采用的 SMART 方法,就是根据 Superscript™ II 逆转录酶的能高效地合成完整的 cDNA,且在合成完 cDNA 第 1 条链从模板脱离时会在 cDNA 第 1 条链末端加上 Oligo(dC) 的特点,设计了含 *gTIA* 酶切位点的 SMART 核苷酸,通过其带有的 Oligo(dC) 与 DNA 第 1 条链末端 Oligo(dC) 配对,作为 cDNA 第 1 条链在 mRNA 3' 端延伸出去的模板,从而在 cDNA 第 1 条链末端加上一段接头序列,便于扩增合成 cDNA 第 2 条链。

3.3 文库质量

本研究最终目的不是构建 cDNA 文库,而是使

用这些文库去筛选所研究的目的基因。本研究构建的是 cDNA 噬菌体文库,其质量的优劣可通过文库的滴度与库容以及文库 cDNA 片段的大小来体现^[8]。构建的 12 h 和 24 h 鲍肝脏 cDNA 文库的滴度分别达到了 9.01×10^6 和 5.3×10^6 , 库容量分别达 5.04×10^6 和 2.95×10^6 , 已满足构建表征性完整的文库的要求,包括了大部分稀有 mRNA 的克隆。

由于稀有基因的转录本都比较大^[12],而 cDNA 逆转录过程往往不完全,从而使 cDNA 的长度短于 mRNA,而要从文库中分离获得目的基因的完整序列信息和功能信息,则要求文库中的重组 cDNA 片段应尽可能完整的反应出天然基因的结构,基于此,本研究采用 Clontech 公司开发出的 SMART 方法,用长距离 PCR(LD-PCR)合成双链 cDNA^[6,8],从而保证 cDNA 序列的完整性,从图 5 可看出,文库中 cDNA 插入子片段大小分布于 0.5~3 kb,表明文库构建是非常成功的。这为今后以该文库进行免疫相关基因的筛选奠定了基础。

3.4 方法完善

本研究虽成功构建了 2 个时相的全长 cDNA 文库,对于发现免疫相关基因奠定了基础,但是,由于细胞中 mRNA 转录本种类繁多,管家基因等高丰度转录本占有很大一部分。而正常情况下机体不表达的基因,很有可能是免疫相关的基因,其转录本很大,拷贝数又少。在构建 cDNA 文库时,由于存在对 cDNA 片段的偏爱作用^[12],即小片段的 cDNA 比大片段的 cDNA 更容易扩增,连接至载体,以及在噬菌体文库中更容易增殖。因此,造成文库中冗余 cDNA 比例很高,克隆到稀有表达基因很难,即使克隆到免疫相关基因,在文库扩增时由于片段太大,也有可能丢失^[12]。因此,在构建 cDNA 文库时,如能通过削减以及均一化^[12-13]富集目的基因,使其在文库中出现频率增加,将可大大促进对目的基因的鉴定,加快发现新基因的速度。此外,由于一些不明原因,逆转录酶即使是 Superscript™ II,在逆转录过程中途会脱离模板,使逆转录反应不完全,亦即往往得不到全长 cDNA^[14]。因此,采用现在普遍使用的生物素-亲和素磁珠分离纯化系统,收集合成全长 cDNA,结合削减与均一化技术,构建削减的均一化全长 cDNA 文库^[12-13],将可进一步提高发现免疫相关基因的速度。

参考文献:

- [1] 张朝霞,王 军,张焦南,等. 东山县九孔鲍细菌性疾病研究

- [J]. 台湾海峡, 2001, 20(2): 193-199.
- [2] 张朝霞, 王 军, 苏永全, 等. 九孔鲍爆发性流行病的病原及病理[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(4): 949-956.
- [3] 周永灿, 潘金培. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展[J]. 水产学报, 1997, 21(4): 449-454.
- [4] 李太武, 丁明进, 相建海, 等. 皱纹盘鲍对河流弧菌-II 苗免疫的研究[J]. 海洋与湖泊, 1997, 28(4): 27-31.
- [5] 翟玉梅, 丁秀云, 李光友. 软体动物血细胞及体液免疫研究进展[J]. 海洋与湖泊, 1998, 29(5): 558-561.
- [6] 王艺磊, 张子平. 日本对虾(*Penaeus japonicus*)精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建[J]. 动物学杂志, 2003, 38(2): 9-13.
- [7] Zhang Z P. Molecular responses to hypoxia in the grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [D]. Hong Kong: City University of Hong Kong, 2002.
- [8] 沈倍奋. 分子文库[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 2-10.
- [9] 冯 斌, 谢先芝. 基因工程技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 63-67.
- [10] 张士璇, 范 晓, 马军英. 海洋生物技术原理和应用[M]. 北京: 海洋出版社, 1998. 151-164.
- [11] 萨姆布鲁克 J[美], 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1995. 396-455.
- [12] Piero C, Yuko S, Norihito H, et al. Normalization and subtraction of Cap-Trapper-Selected cDNAs to prepare full-length cDNA libraries for rapid discovery of new genes [J]. Genome Research, 2000, 10(10): 1 617-1 630.
- [13] 赵大中, 陈 民, 种 康, 等. 一种改进的构建杂交扣留 cDNA 文库的方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25(4): 373-376.
- [14] Manjula D, Isabelle H, Lee C, et al. Full-length cDNAs: more than just reaching the ends[J]. Physiol Genomics, 2001, 6: 57-80.
- [15] 王淑红, 王艺磊, 张朝霞, 等. 弧菌和大肠杆菌感染对杂色鲍无细胞血淋巴中几种酶活力的影响[J]. 中国水产科学, 2004, 11(1): 37-40.

Construction of liver full-length cDNA libraries of abalone *Haliotis diversicolor* infected with *Vibrio parahaemolyticus* for 12 h and 24 h

WANG Yi-lei¹, ZHANG Zi-ping², DAI Jun¹, ZOU Zhi-hua¹, WANG Shu-hong¹

(1. Fisheries College, Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, USA)

Abstract: To construct different immunological phase full-length cDNA libraries of *Haliotis diversicolor*, RDP reagent was used to isolate total RNA from liver of *Haliotis diversicolor* which had been exposed to *V. parahaemolyticus* at different time courses. Oligotex kit of QIAGEN was used to separate mRNA from the total RNA. With the SMART technology, SMART III oligo and CDS Oligo(dT) primers containing *sf*IA and *sf*IB restriction enzyme digested sites respectively were used to synthesize the first-strand cDNA. And the double-strand cDNA which has the *sf*IA and *sf*IB restriction enzyme digested sites at its two ends was synthesized by LD-PCR. After digested with *sf*II, cDNA were fractionated by using CHROMA™ SPIN-400. The full-length cDNAs (longer than 500 bp) were pooled and ligated into *sf*II-digested λTriplex2 Vector. Ligation product was packaged into lambda capsids using the MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts (EPICENTRE) to generate the *Haliotis diversicolor* different immunological phase full-length cDNA libraries. The titer of unamplified cDNA libraries were 9.01×10^6 for 12 h library and 4.4×10^6 for 24 h library, respectively. And the containing capacities of these two libraries were 5.4×10^6 and 2.6×10^6 cDNA clones, respectively. The length of cDNA inserts ranges from 500 bp to 3 kb, indicating that the quality of these two cDNA libraries is very good. And it will form a fundamental base for further screen and clone of the genes related to immunology.

Key words: *Haliotis diversicolor*; cDNA library; SMART; immunological phase; liver

Corresponding author: ZHANG Zi-ping. E-mail: zipingcn@msu.edu

* This study was funded by the grant from the National Marine 863 Projects of China (No. 2002AA629220).