

鲤脑组织 cDNA 文库的构建及脑室管膜素基因鉴定

李言¹, 何薇¹, 丁雷¹, 李勇¹, 梁利群^{2,3}, 雷清泉²

(1. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 110623; 2. 哈尔滨理工大学, 黑龙江 哈尔滨 150001; 3. 黑龙江水产研究所, 农业部北方鱼类基因工程育种实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要: 用 Gubler-Hoffman 法构建了低温下鲤 (*Cyprinus carpio* Linnaeus) 脑组织 cDNA 文库, 经测定库容量为 5.7×10^5 CFU/mL, 文库的重组率接近 95%, 平均插入片段长度约为 1.5 kb, 符合文库保存和筛选实验的要求。同时, 根据鲤与低温相关消减 cDNA 文库中低温下特异表达基因片段序列, 设计 PCR 引物在此 cDNA 文库中进行 PCR 检测和序列测定, 使用 BLAST 软件将测序的 10 个 cDNA 序列同 GenBank 等数据库进行比对, 结果显示 8 个阳性克隆有相关同源性, 2 个克隆为功能未知的基因, 全长率近 75%; 以上结果说明本实验所构建的 cDNA 文库质量较高, 可作为筛选与鲤低温性状相关的功能基因的重要资源。同时对其中一个与低温相关的基因脑室管膜素基因构建了表达载体, 为进一步验证该基因在鱼类低温适应中所发挥的作用及其作用机理奠定了基础。[中国水产科学, 2009, 16(2): 147–155]

关键词: 鲤; 脑; cDNA 文库; 低温适应; 脑室管膜素

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)02-0147-09

鱼类对温度的适应问题是一个世界性难题, 已报道的鱼类耐低温机理研究多是从生理、生化角度进行的探索, 如细胞膜的流动性、钙离子泵的差异^[1-4]、酯类及一些同工酶类代谢的差异^[5]等。但是关于鱼类的耐低温适应机制的分子遗传基础尚不明了。梁利群等^[6]初步建立了适于鱼类低温适应分析的实验鱼体系, 获得了 6 个与低温性状相关的分子标记, 确定了低温性状是数量性状。同时, 梁利群等^[7]利用抑制消减杂交技术构建了鲤低温差异表达的脑组织消减 cDNA 文库, 获得 60 个 4 °C 脑组织特异表达或表达增强的基因 (或基因片段), 并对低温特异表达的阳性克隆进行了序列测定, 得到质膜钙转运腺苷三磷酸酶 3、室管膜素前体、尿嘧啶激酶、硫氧还蛋白类蛋白 4A、3-羟基异丁酸脱氢、斑马鱼 (*Denio rerio*) 酪氨酸 3-单氧合酶/色氨酸 5-单氧合酶激活蛋白、斑马鱼

跨膜蛋白以及冰核蛋白等与低温相关的基因。而其他学者研究证实, 冷适应下许多鱼类基因的表达呈上调表达, 这些基因包括细胞色素 c 氧化酶^[8]、肉毒碱软脂转移酶^[9]、Wap65^[10]、抗冻蛋白基因^[11]等。这些研究结果再一次表明, 鱼类的耐低温性状是数量性状受多基因控制的。可见, 最大限度地获得与低温性状相关的基因, 对进一步阐明鱼类低温适应研究机制具有重要的参考价值。

在功能基因克隆中利用抑制消减文库得到的大多为基因片段, 因此构建全长 cDNA 序列文库是获得基因全长序列的关键。近几年, 在水产动物领域已陆续建立了斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides* Hamilton) 卵巢^[12]、中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards) 卵巢^[13]、鲤外周白细胞^[14]、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 鳃^[15]、大鲵 (*Andrias davidianus*) 肝^[16]、银鲫

收稿日期: 2008-05-19; 修订日期: 2008-10-07.

基金项目: 国家 973 计划项目 (2004CB117405).

作者简介: 李言 (1983 -), 女, 硕士研究生, 从事鱼类基因工程育种研究. E-mail: liyan-piq@163.com

通讯作者: 梁利群, 研究员, 从事水产动物功能基因研究. Tel: 0451-8486314; E-mail: llq-1019@163.com

(*Carassius auratus gibelio* Bloch) 和彩鲫(*Carassius auratus color variety*) 卵母细胞^[17]等不同组织的cDNA文库,并通过测序获得了大量有研究和开发价值的新基因,但尚未见鲤低温脑cDNA文库构建的报道。

本实验首次以鲤脑组织为材料,利用Gubler-Hoffman法(即Linker Primer法)构建鲤低温脑cDNA文库,旨在分离获得与鲤低温性状相关的较完整基因序列,为进一步从分子水平上揭示鱼类低温适应机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

实验鲤采自本实验室低温适应条件下6尾健康雄鱼,平均体质量400 g;RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit 购自QIAGEN公司;cDNA Library Construction Kit、Oligotex[™]-dT30<Super>mRNA Purification Kit、DL-2000 DNA Maker 购自TaKaRa公司;DEPC购自BBI公司;琼脂糖购自BIOWEST公司;GOLDView染料购自赛百盛公司;实验中的其他试剂均为进口或国产分析纯试剂。常规试剂按《分子克隆实验指南》^[18]配制。

1.2 方法

1.2.1 脑组织总RNA提取及质量检测 取新鲜鲤脑组织(全脑)约600 mg于研钵中,迅速加入液氮并研磨成粉末,立即用预冷的药匙将其移入已加入约8 mL QIAzol的管中,剧烈振荡,充分混匀,严格按照RNeasy[®] Lipid Tissue Mini Kit说明书操作提取总RNA。沉淀用DEPC水溶解保存。取1 μ L总RNA样品,用DEPC处理过的水稀释100倍后,用Eppendorf 6131型紫外分光光度计分别测定样品在260 nm和280 nm波长的吸光度值。同时取1 μ L样品用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA的完整性。RNA样品浓度按以下公式计算: $[RNA]=OD_{260} \times D \times 40 \text{ ng/mL}$,公式中 D 为稀释倍数。RNA的纯度则根据 OD_{260}/OD_{280} 的比值确定。

1.2.2 mRNA的分离与纯化 按照TaKaRa公司Oligotex[™]-dT30<Super>mRNA Purification Kit试剂盒的步骤进行mRNA的分离纯化。经过Oligo(dT)₃₀纤

维素柱纯化后,得到mRNA。用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测所分离、纯化的mRNA。并测定样品 OD_{260} 和 OD_{280} ,计算mRNA的量用于建库。

1.2.3 cDNA第一链的合成 向无RNA酶污染的200 μ L微量离心管中加入 $5 \times 1 \text{ st Strand Synthesis Buffer}$ 4.0 μ L、甲基化dNTP混合物1.2 μ L、RNase Inhibitor (20 U/ μ L) 1.0 μ L、含Not I酶切位点的Oligo(dT)₁₈ Anchor Primer (1 μ g/ μ L) 2.0 μ L,混匀后加入10.8 μ L预变性的mRNA(约5 μ g)。室温放置10 min后,加1 μ L M-MLV反转录酶(200 U/ μ L)至反应体系中。42 $^{\circ}\text{C}$ 温育1 h后,将离心管转置于冰上。

1.2.4 cDNA第二链的合成 向20 μ L cDNA第一链的合成液中加入 $5 \times 2 \text{ nd Strand Synthesis Buffer}$ 30 μ L、平头反应dNTP混合物4.5 μ L、RNase-free H₂O 87.5 μ L、*E. coli* RNase H/*E. coli* DNA Ligase Mixture 2 μ L、*E. coli* DNA Polymerase I 2 μ L,混匀后置于16 $^{\circ}\text{C}$ 冷浴2 h;70 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min,室温放置5 min;加入4 μ L T₄ DNA Polymerase并混匀,于37 $^{\circ}\text{C}$ 反应10 min。反应结束后纯化双链cDNA并取3 μ L用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 接头连接、酶切及短链cDNA的去除 利用T₄ DNA连接酶连接EcoR I-Sma I接头,再用Not I酶消化,消化后的cDNA片段用葡聚糖凝胶柱层析,除去已消化的接头碎片和小于400 bp的片段,收集片段大小合适的cDNA样品。用酚/氯仿/异戊醇(体积比25:24:1)抽提纯化所收集的cDNA,干燥后用15 μ L RNase-free H₂O溶解。具体操作参照TaKaRa公司的cDNA Library Construction Kit的说明进行Spin Column的准备和短链cDNA去除。

1.2.6 cDNA与pAP3neo载体的连接与转化 向含15 μ L cDNA样品的管中加入2 μ L $10 \times \text{T}_4 \text{ DNA Ligase Buffer}$ 、1 μ L pAP3neoPredigested Vector (EcoR I和Not I酶切后的大骨架 100 ng/ μ L)、2 μ L T₄ DNA Ligase (350 U/ μ L),轻轻混合后12 $^{\circ}\text{C}$ 过夜反应。向上述反应液中加入80 μ L $1 \times \text{TE Buffer}$,用等量(100 μ L)的苯酚/氯仿/异戊醇(体积比25:24:1)抽提1次,再用等量(100 μ L)的氯仿/异戊醇(体积比24:1)抽提1次;向上清中加入1/10量(10 μ L) 3 mol/L Sodium Acetate(pH5.2)、

4 μL Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2倍量的100%乙醇,充分混合。室温15 000 r/min离心30 min,除去上清。用70%乙醇清洗沉淀。干燥沉淀后,用20 μL 1 $\times$ TE Buffer溶解沉淀。将-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的*E.coli* DH10B Electro-Cells于冰上融解,取1 μL 连接产物进行电击转化,电压为1.8 kV,电击时间为4.6 ms;加入1 mL SOC于37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌1 h。

1.2.7 cDNA文库的鉴定 取100 μL 转化产物用SOC培养基按1/100和1/1 000稀释,分别涂100 μL 稀释液至 ϕ 15 cm LB/Amp(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp)平板培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,计数平板菌落。依据公式计算转化效率:克隆数目(CFU) $\times$ 总转化混合物体积(μL)/稀释混合物涂板体积(μL) $\times$ 稀释系数 $\times$ 转化所用质粒量(μg);文库容量的计算公式:转化效率 $\times$ 转化所用质粒量^[4]。在测转化效率的平板上随机挑取20个单菌落,10个做菌落PCR检测,10个进行序列测定。在10 μL 反应体系中,除模板外依次加入

6.9 μL dH₂O、1 μL 10 $\times$ ExTaqBuffer (Mg²⁺ Plus)、1 μL dNTP Mixture (2.5 mmol/L)、0.5 μL T₇ Promoter Primer (5 pmol/ μL)、0.5 μL T₃ Promoter Primer (5 pmol/ μL)、0.1 μL TaKaRa Ex Taq HS (0.5 U/ μL)。PCR反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性1 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,30个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。反应产物用1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。使用NCBI的BLAST功能(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)将测序的10个序列同GenBank等数据库进行比对,根据菌落PCR和序列测定的结果推测重组率、插入片段长度及完整性。

1.2.8 鲤脑室管膜素cDNA的真核表达载体的构建

根据序列测定的结果,进行对鲤脑室管膜素cDNA的真核表达载体的构建实验(图1)。主要步骤为:1)脑室管膜素基因cDNA的胶回收、酶切、酶切产物纯化;2)pCK-EGFP质粒的双酶切及酶切检测;3)连接反应及产物转化;4)重组质粒的制备;5)PCR检测;6)双酶切检测。

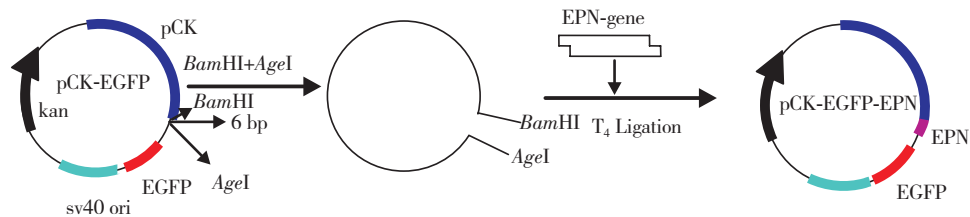


图1 融合绿色荧光蛋白脑室管膜素基因真核表达载体的构建流程图

Fig. 1 Flow chart of construction of pCK-EGFP-EPN eukaryotic expression vector

2 结果与分析

2.1 总RNA质量鉴定和mRNA的分离

经1.2%琼脂糖电泳鉴定,可看到清晰的28S、18S和5S条带(图2);28S条带明显亮于18S条带,比例大约为2:1,表明总RNA的完整性良好。总RNA的OD₂₆₀/OD₂₈₀为2.02,表明所提RNA纯度高。分离纯化的mRNA产量为18.9 μg ,得率为1.4%(图3)。

2.2 双链cDNA的合成

纯化后所得的mRNA反转录合成第一链,经1.0%琼脂糖电泳测得,cDNA条带主要集中在500~2 000 bp(图4),分布良好,且无降解现象。

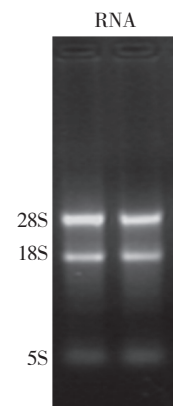


图2 鲤脑组织总RNA

Fig. 2 Total RNAs isolated from brain of common carp

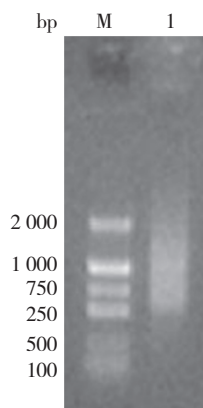


图3 鲤脑组织 mRNA

M: DL2000 Marker; 1: 纯化后的 mRNA

Fig. 3 mRNA isolated from brain of common carp

M: DNA Marker DL2000; 1: Isolated mRNA

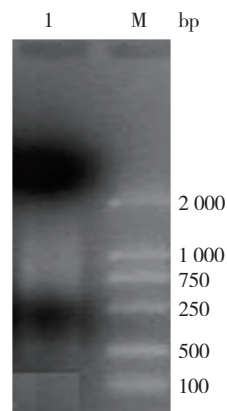


图4 鲤脑组织 cDNA 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳

M: DL2000 Marker; 1: 合成后的双链 cDNA

Fig. 4 cDNA agarose gel electrophoresis of common carp brain

M: DNA Marker DL2000; 1: Double-stranded cDNA

2.3 文库质量的评定

鲤脑 cDNA 文库在 1/100 和 1/1 000 稀释度的 ϕ 15 cm LB/Amp (100 μ g/mL Amp) 平板培养基上, 分别得到 580 个和 56 个单克隆, 取其平均值, 据转化效率和文库容量的公式计算文库转化效率为 $5.7 \times 10^7/\mu$ g pAP3neo, 库容量不低于 5.7×10^5 CFU/mL。真核生物每时每刻表达的 mRNA 约占生物所有基因的 15%, 约 1.5 万种, 其中低于 14 拷贝/细胞的低丰度 mRNA 种类约占 30%, 因此根据 Clarke-Carbon 公式^[19]: $N = \ln(1-P) / \ln(1-n/T)$ (P 为文库中包含细胞中任何一种序列信息的概率, 通常设为 99%; n 为一种稀有 mRNA 在总 mRNA 中所占的比例; N 为文库中以 P 为概率出现细胞中任何一种序列理论上应具有的最少重组克隆数; T 为细胞中表达出的所有 mRNA 的总拷贝数) 得知, 一个具有完好代表性的文库至少应具有 2.073×10^5 以上的库容量, 而实验中得到的克隆数约为 5.7×10^5 , 基本上能够满足筛选低拷贝基因的要求。随机挑选 cDNA 文库的阳性单克隆进行 PCR 扩增 (图 5) 和测序鉴定后, 得出文库的重组率达 95%, 扩增出的片段经凝胶成像用分析系统分析, 平均插入片段长度约为 1.5 kb。

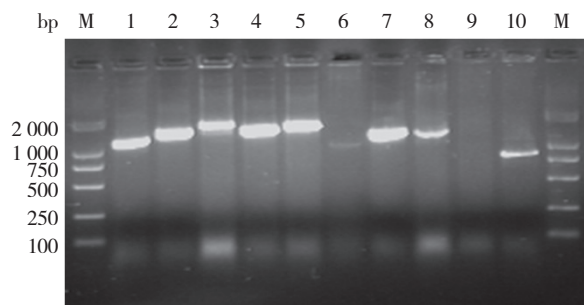


图5 鲤 cDNA 文库插入片段的 PCR 鉴定

M: DL2000 Marker; 1-10: 为随机选取的 10 个 cDNA 克隆

Fig. 5 PCR analysis of 10 recombinant clones in cDNA library of common carp

M: Marker DL2000; 1-10: Randomly selected cDNA clones

2.4 测序结果初步分析

通过序列测定得到 10 个鲤脑组织 cDNA 序列, 去除载体序列后, 将序列与 GenBank 数据库进行核苷酸同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。结果在 10 条序列中 8 条具有相关同源信息, 其中 6 条为全长 cDNA 序列, 全长率接近 75%; 第 7、8 号阳性克隆未找到同源性序列, 可能为功能未知的新基因, 其余 8 个阳性克隆的序列分析和同源性比较结果见表 1。

表1 cDNA 序列分析和同源性比较结果
Tab. 1 cDNA sequence analysis and results of identities

克隆编号 Clone number	片段大小/bp Insert size	同源性比较 Homolog (protein)	<i>E</i>	GenBank 编号 GenBank accession no.
cDNA-1	3765	斑马鱼膜葡萄糖转运蛋白基因	4.00e-166	BC076560
cDNA-2	1820	斑马鱼膜整合蛋白 2B 基因 (ITM2B)	0.0	BC044480
cDNA-3	693	斑马鱼 NADH 脱氢酶 1 基因	6.00e-140	BC059674
cDNA-4	1762	斑马鱼泛素基因	0.0	XM_001332762
cDNA-5	1726	Stathmin 家族基因	0.0	XM_001017850
cDNA-6	1107	疟疾原虫假定蛋白	4.1	CAI04197
cDNA-9	1618	斑马鱼微管蛋白家族基因	0.0	BC071501
cDNA-10	1553	金鱼脑室管膜素-Ⅱ基因	0.0	J04986.1
		鲫脑室管膜素-Ⅰ基因	0.0	X14134.1

2.5 脑室管膜素cDNA真核表达载体的构建和鉴定

通过对8个阳性克隆的序列分析和同源性比较,发现编号cDNA-10序列与金鱼脑室管膜素基因高度同源,并且该基因在4℃表达量明显高于10℃,它可能在鱼类低温适应中发挥一定的作用。利用RT-PCR技术获得该基因的完整开放读码框645 bp,其编码215个氨基酸,其中信号肽20个氨基酸,成熟肽195个氨基酸。

提取pCK-EGFP质粒,并利用*Bam*HⅠ和*Age*I进行双酶切产生定向克隆位点,取2 μL双酶切纯化产物转化本实验室保存的大肠杆菌感受态细胞并铺在含卡那霉素的LB平板培养基上,37℃培养过夜来初步推测酶切效果,无菌生长,估计双酶切比较完全。随机挑取了16个重组克隆进行细菌小量培养,然后提取质粒(图6),重组质粒大小在7 000 bp左右;利用PCR方法对1-14号重组质粒进行质粒正确性的检测,1-6、10、13号质粒扩增出目的条带(图7);针对PCR检测结果挑取1、5、13号质粒进行*Bam*HⅠ和*Age*I双酶切检测,均有目的带产生(图8)。质粒构建完成。

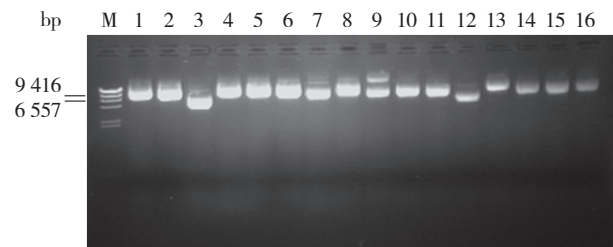


图6 构建的融合绿色荧光蛋白的脑室管膜素真核表达载体
M: Lambda DNA/*Hind*Ⅲ marker; 1-16: 重组克隆。

Fig.6 Constructed ependymin eukaryotic expression vector fused green fluorescent protein

M: Lambda DNA/*Hind*Ⅲ marker; 1-16: Recombinant clones.

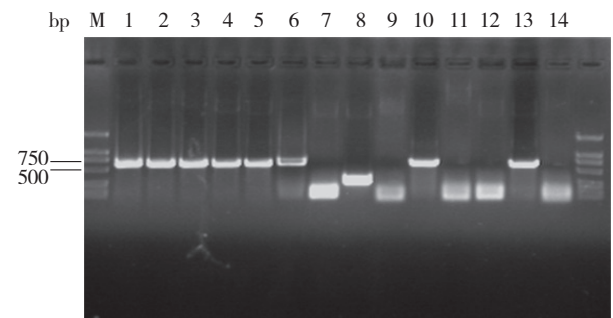


图7 重组质粒的PCR检测

M: DL2000 Marker; 1-14: 重组质粒。

Fig. 7 PCR amplification detection of recombinant plasmids

M: DL2000 Marker; 1-14: Recombinant plasmid.

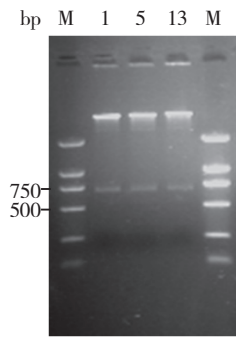


图8 *Bam*H I 和 *Age* I 双酶切重组质粒的电泳结果

M: DL2000 Marker; 1,5,13: 重组质粒.

Fig.8 Agarose gel electrophoresis for the product of restriction endonuclease analysis of recombinant plasmids with *Bam*H I and *Age* I

M: DL2000 Marker; 1,5 and 13: Recombinant plasmid.

3 讨论

3.1 关于cDNA文库质量的评定

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2个方面^[20]。文库的代表性是指文库中所包含的重组cDNA分子反映来源细胞中表达信息(即mRNA种类)的完整性,可用库容量来衡量。根据Clarke-Carbon公式,为满足筛到低丰度mRNA的要求,文库至少应具有 2.073×10^5 以上的库容量;而实验中得到的克隆数约为 5.7×10^5 ,基本上能够满足筛选低拷贝基因的要求。

另外重组cDNA片段的完整性是反映cDNA文库质量的另一个重要因素,其根本取决于mRNA的完整程度。真核生物来源的mRNA的完整性一般以28S rRNA和18S rRNA来衡量,本研究提取的鲤脑总RNA,其28S rRNA和18S rRNA的宽度和亮度比接近于2:1,并清晰可见,可用于构建文库;其PolyA⁺ RNA分布在0.5~3 kb,为保证cDNA片段的完整性,插入片的平均大小应不小于1 kb,而本实验平均插入片段长度约为1.5 kb,结果与大多已报道的cDNA文库^[12-14,16]结果相似,但也有少数报道插入片段在500 bp左右^[15],这可能与研究种类、组织、不同mRNA的丰度以及文库构建方法等因素有关。

3.2 cDNA文库构建中使用的载体

质粒文库需要以活的转化菌形式保存和扩增,

保存条件较严格^[21]。本实验采用pAP3neo质粒作为构建鲤脑cDNA文库的载体,它是一种穿梭型质粒,既可以在真核细胞中表达,也可以在原核细胞中表达,在其*Eco*RI酶切位点前有T₇启动子,有利于插入片段的体外转录;可直接用于从文库中筛选到的阳性克隆的表达研究,有利于进一步研究目的基因的表达和调控情况,具有广泛的应用前景。

3.3 鲤脑cDNA文库在鲤低温适应功能基因研究中的用途及应用方法

脑组织可感知温度变化,并对温度适应做出一系列指示,低温诱导表达的基因很可能存在于脑组织中并有可能成为调控低温适应性反应的因素;因此进行鲤脑组织特异性表达基因分子生物学基础研究的最终目的之一是通过深入探讨与鲤低温适应性相关的基因,进一步了解这些基因的作用机制及规律,并培育出具有一定低温适应能力的优质品种(或品系)。具体研究方法为利用鲤低温差异表达的消减cDNA文库中的低温阳性克隆所设计的特异性引物,通过PCR技术^[22]从鲤脑组织cDNA文库中筛选出与鲤低温适应性状相关的多种cDNA,确定此目的cDNA所在的克隆;挑取该菌进行扩大培养,随机挑取10个克隆并提取质粒,进行二重PCR检测、相应的酶切检测和测序工作等;并通过文库载体的pAP3neo 5'端引物T₇ primer和3'端引物T₃ primer扩增纯化的质粒可得到目的基因的全长cDNA序列。关于从此文库中克隆与研究鲤低温适应相关基因的分子生物学基础工作目前正在进行之中。

3.4 序列测定结果的分析

本研究中,随机挑取10个阳性克隆进行序列测定,在已知基因中,编号为cDNA-4的基因与斑马鱼的泛素基因高度同源,泛素是由Goldstein等(1975)首先发现的一种在真核生物细胞内高度保守的多肽,单个泛素分子仅由76个氨基酸组成,紧密折叠成球形,与其他蛋白都是通过C₂末端第76位甘氨酸来连接的,它通过泛素-蛋白体系统在真核细胞的蛋白降解过程中发挥重要作用,在调控肌肉蛋白质代谢方面可能具有一定作用^[24-27]。编号为cDNA-5的基

因与斑马鱼的 Stathmin 家族基因高度同源, 此类蛋白家族是普遍存在于细胞内的一种高度保守多肽, 由 149 个氨基酸残基组成, 其可通过磷酸化形式参与胞内多种第二信使传导途径, 在细胞内信号传导过程中起重要作用。

编号为 cDNA-10 的基因通过 GenBank 比对, 确定其功能为脑室管膜素基因。台湾学者孙光煊^[25]通过对鲤脑组织在不同温度下基因差异表达的研究发现, EPN (脑室管膜蛋白) 作为脑组织特异性表达蛋白, 在由 25 °C 降至 6 °C 过程中其活性提高了 10 倍, 并且在温度回升到 25 °C 时仍然维持着该活性。尽管脑组织中可溶性脑室管膜蛋白的数量没有因冷适应驯化而发生变化, 但在不溶纤维聚合物中的水平提高了 2 倍。据推测, 在鱼体冷适应驯化的过程中,

EPN 对神经系统发挥着重要作用, 它不仅阻止神经系统的损伤, 同时也可促进其再生, 从而使得鱼类可以耐受低温。通过提取融合脑室管膜素基因的质粒并进行脑室管膜素基因的真核表达, 进一步了解了该基因在降温过程中的作用规律及机制。结果显示, 鲤脑室管膜素成熟蛋白由 195 个氨基酸组成, 包含 2 个糖基化位点。将推测的鲤脑室管膜素氨基酸序列与其他已知鱼类的脑室管膜素进行同源性比较 (图 9), 结果表明, 鲤脑室管膜素与金鱼 GF-I (GenBank 登录号 X14134 和 U0043) 同源性最高, 达 95%, 与 GF-II (J304986) 同源性为 93%; 与鲑科鱼类脑室管膜素蛋白同源性较低, 如与虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) OM-I (M93697) 和 OM-II (M93698) 同源性分别为 42%、40%, 与大西洋鲑 (*Salmo salar*) SS-II (M93699)

CC-I	MHTVKLLCVVFS-CLCAVAWAS--SNR-QPCHSPPLISGTMKVVSTGGHDLASGEFS	53
GF-I	MHTVKLLCVVFS-CLCAVAWAS--SHR-QPCHAPPLTSGTMKVVSTGGHDLKSGEFS	53
GF-II	MHTVKLLCVVFS-CLCAVAWAS--SDR-QPCHSPPLISGTMKVVSTGGHDLASGEFS	53
OM-I	MQAFAVAALSIWLC LGATT LAE--SNGPQHCTSPNMIGVLT V LAL TGGEIKATGHYS	55
OM-II	MQDFAF AALSIWLC LGATT LAE--SNGPQHCTSPNMIGVLT V MAL TGGEIKATGHYS	55
SS-II	MQDFAF AALSIWLC LGATT LAE--SNGPQHCTSPNMIGVLT V MAL TGGEIKATGHYS	55
CC-I	YDSKANKFRFVEDAAHANKTSHT-DVLVHFEEGTLYEIDSKNESCKKETLQFRKH	107
GF-I	YDSKANKFRFVEDTAHANKTSHM-DVL I HFEEGVLYEIDSKNESCKKETLQFRKH	107
GF-II	YDSKANKFRFVEDAAHANKTSHT-DVLVHFEEGTLYEIDSKNESCKKETLQFRKH	107
OM-I	YDSTDKKIRFTESEMHLNKTEYLEDY L M L FEEGTFYDIDMKNQSCCKMSLHSHAH	110
OM-II	YDSTNKKLR FTESEMHLNKTEYLEDY L M L FEEGTFYDIDMKNQSCCKMSLHSHAH	110
SS-II	YDSTDKKIRFTESEMHLNKTEYLEDY L M L FEEGTFYDIDMKNQSCCKMSLHSHAH	110
CC-I	LMEIPPDATHESEIYMGSPSITEQGLRVRVWSGKLPELHAHYSLSITSCGCLPVSGSY	165
GF-I	LMEIPPDATHESEIYMGSPSITEQGLRVRVWNGKFP ELHAHYSMTTSCGCLPVSGSY	165
GF-II	LMEIPPDATHESEIYMGSPSITEQGLRVRVWSGKLPELHAHYSLSITSCGCLPVSGSY	165
OM-I	ALELPAGAAHQVELFLGSDTVQEEDIKVN I WTGSPETKGQYFLSITVGECLTLSTFY	165
OM-II	ALELPAGAAHQVELFLGSDTVQEDNIKVN I WMGSVAETKGQYFALITVGECLTLSTFY	165
SS-II	ALELPAGAAHQVELFLGSDTVQEENIKVN I WMGSVAETKGQYFVLITVGECLTLSTFY	165
CC-I	YGDKKDLFFSFFGVETEVD D P Q V F V P P A Y C E A V A F E E A P D D E S -- F F D L F H - D	215
GF-I	HGEKKDLFFSFFGVETEVD D L Q V F V P P A Y C E G V A F E E A P D D E S -- F F D L F H - D	215
GF-II	YGDKKDLFFSFFGVETEVD D L Q V F V P P A Y C E G V A F E E A P D D E S -- F F D L F H - D	215
OM-I	STD S I T L L F S N S E V V T E V K A P E V F N L P S F C E A V E L E E A P E G Q K N D F F S L F N S V	221
OM-II	STD S I T L L F S N S E V V T E V K A P E M F T L P S F C E A V E L E E T P K G Q K N D F F N I F N T V	221
SS-II	STD S I T L L F S N S E V V T E V K A P E M F T L P S F C E A V E L E E T P K G Q K N D F F N I F N T V	221

图9 推断的鲤脑室管膜素蛋白氨基酸序列与推断的金鱼 GF-I、GF-II, 虹鳟 OM-I、OM-II, 大西洋鲑 SS-II 序列相对应的脑室管膜素蛋白氨基酸序列间同源性比对
阴影区表示氨基酸序列的一致; (-) 表示提高比对率的空位

Fig. 9 Alignment of deduced carp EPN aa sequences with aa sequences deduced from the following sequences
gf-I and gf-II of *Carassius auratus*, om-I and om-II of *Oncorhynchus mykiss*
ss-II of *Salmo salar*; aa identity is shown by shade and (-) means gap to improve alignment

同源性为40%。这反映了该蛋白的在进化过程中保守性较低,如鲤等温水性鱼类与同类环境中的鱼类该蛋白保守性较高,虹鳟等冷水性鱼类情况也是如此,在冷水性鱼类中该蛋白的保守性较高,而鲤科等温水性鱼类与鲑科等冷水性鱼类该基因变异程度很高,所以在一定程度上可以认为该基因在进化过程中随着鱼类生活环境的差异(如水温的差异)在进化过程中变异程度较大,此基因与温度相关性很强,而这种基因差异很可能是与温度相适应的一种表现,也就是对温度适应的一种反应。因此推测脑室管膜素基因的表达在鱼类温度适应中发挥重要的作用,有必要进一步研究该基因的作用机制及其作用规律。

由此可见,鲤脑组织质粒cDNA文库的成功构建,不仅丰富和保存了鲤基因资源,而且对于鲤中有明确功能的特异基因的克隆、表达以及新基因的克隆与功能研究奠定了物质基础。

致谢: 本实验得到黑龙江水产研究所张晓峰副研究员、耿波助理研究员、哈尔滨工业大学邹庆薇同学以及大连水产学院顾颖同学的大力支持,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Lyons J M, Granham D, Rasion J K. Low temperature stress in corp plants: The role of the membrane[M]. New York: Academic Press, 1970,33-56.
- [2] 邓会山,桂远明. 鱼血红细胞膜流动性的研究[J]. 大连水产学院学报,1993,8(1):9-13.
- [3] Brown W D. Glucose metabolism in carp[J]. Cellular Comp Physiol, 1960,55: 81-85.
- [4] 冯祖强,王祖熊. 鲑鱼冷休克及其死亡的某些生化因素[J]. 水生生物学集刊,1984,8(3): 290-297.
- [5] 桂远明. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化Ⅱ——脑*AchE*、*LDH*同工酶、*EST*同工酶[C] //北方越冬鱼类死亡原因及提高成活率的研究. 1995:83-92.
- [6] 梁利群,孙效文,沈俊宝,等. 鲤鱼抗寒性状的RAPD分析[J]. 中国水产科学,1997,4(3): 89-91.
- [7] 梁利群,李绍戊,常玉梅,等. 抑制消减杂交技术在鲤鱼抗寒研究中的应用[J]. 中国水产科学,2006,13(2): 193-199.
- [8] Hardewig I, Van Dijk PLM, Moyes C D, et al. Temperature-dependent expression of cytochrome-c oxidase in Antarctic and temperate fish[J]. Am J Physiol,1999,277: R508-R516.
- [9] Rodnick K J, Sidell B D. Cold acclimation increases carnitine palmitoyltransferase I activity in oxidative muscle of striped bass[J]. Am J Physiol,1994,266: R405-R412.
- [10] Kikuchi K, Yamashita M, Watabe S, et al. The warm temperature acclimation- related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression[J]. J Biol Chem,1995,270: 17 087-17 092.
- [11] Pickett M H, Hew C L, Davis P L. Seasonal variation in the level of antifreeze protein mRNA from the winter flounder[J]. Biochim Biophys Acta,1983,739:97-104.
- [12] 张勇,张为民,李欣,等. 石斑鱼卵巢cDNA文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆[J]. 中山大学学报: 自然科学版,2003,42(2): 66-69.
- [13] 马长艳,周开亚,郭豫杰,等. 中华绒螯蟹卵巢差减cDNA文库的构建[J]. 动物学研究,2003,24(1): 53-56.
- [14] 卢强,丰培金,李莲瑞,等. 正常鲤外周血白细胞cDNA 文库的构建[J]. 水产学报,2004,28(5): 585-588.
- [15] 王维新,史成银,黄健. 中国明对虾鳃细胞全长cDNA文库的构建[J]. 海洋水产研究,2004,25(5): 6-11.
- [16] 杨芳,贺智敏,詹显全,等. 大鲈肝脏组织定向cDNA文库的构建及鉴定[J]. 动物学报,2004,50(3): 475-478.
- [17] 樊连春,谢京,汪洋,等. 银鲫与彩鲫卵母细胞cDNA文库构建及周期蛋白A1的cDNA克隆[J]. 水生生物学报,2000,24(6): 573-581.
- [18] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南: 第3版[M]. 北京: 科学出版社,2002: 8.
- [19] Clarke L, Carbon J. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome [J]. Cell,1976,9: 91-99.
- [20] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA文库构建策略及其分析研究进展[J]. 云南农业大学学报,2006,21(1): 2-6.
- [21] 朱靖,杨娜娜,李浩,等. λ 噬菌体cDNA 文库向质粒cDNA文库转化的研究[J]. 家畜生态学报,2006,27(1): 27-32.
- [22] Alfandari D, Darribere T. A simple PCR method for screening cDNA libraries[J]. PCR Methods Appl,1994 4: 46-49.
- [23] Tang Shye-Jye, Sun Kuang-Hui, Sun Guang-Huan, et al. Cold-induced ependymin expression in zebrafish and carp brain: implications for cold acclimation [J]. FEBS Letters,1999,459:95-99.
- [24] Goldstein G, Scheid M, Hammerling U, et al. Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1975,72: 11-15.

- [25] Vijay-Kumar S, Bugg C E, Cook W J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution [J]. Molec Biol, 1987, 194: 531–544.
- [26] Herskho A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation [J]. Annual of Review Biochemistry, 1992, 61: 761–807.
- [27] Jentsch S. The ubiquitin–conjugation system [J]. Ann Rev Gen, 1992, 26: 179–207.

Construction and identification of cDNA library from common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus) brain

LI Yan¹, HE Wei¹, DING Lei¹, LI Yong¹, LIANG Li-qun^{2,3}, LEI Qing-quan²

(1. College of Aquaculture Science and Technology, Dalian Fisheries University, Dalian 110643, China; 2. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150001, China; 3. Key Laboratory of Bioengineering Breeding of Northern Finfish, Ministry of Agriculture, Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Encephalic cDNA library of common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus) was constructed by Gubler-Hoffman technique. First, total RNA of brain was extracted by QIAzol reagent and determined by agarose electrophoresis and UV meter. The result showed that the purity and integrity of total RNA were both good. mRNA was isolated with a column of oligo (dT) 30 cellulose and then was reversely transcribed to the first strand cDNA by using a modified oligo (dT) primer (contained *Not* I site). Second, strand cDNA was produced by employing replacement synthesis technique. After adding *Eco*R I adaptor and digesting with *Not* I, double strand cDNAs were fractionated with Sepharose CL-2B gel filtration medium and sample fractions (>400 bp) were collected. Finally, ds cDNAs were ligated directionally into pAP3neo vectors and the recombinant vectors were electroporated into *E. coli* DH10B. A plasmid cDNA library with common carp brain was constructed. The capacity of library reaches 5.7×10^5 CFU/mL in which the percentage of recombinant clones was 95% and the average size of inserts was 1.2 kb approximately. Ten positive clones were sequenced and aligned on Internet, which showed higher identities among 8 clones and 2 clones maybe unknown genes and the percentage of complete cDNA sequences was 75%. These results indicated the encephalic cDNA library of common carp has excellent quality. This library provided a useful resource for the functional genomic research related to cold tolerant traits of common carp. Meanwhile, eukaryotic expression vector about one of the genes was constructed. This study will further the benefit verification of the function and mechanism of the gene in the cold acclimation process of fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (2): 147–155]

Key words: common carp; brain; cDNA library; cold-tolerant trait; ependymin

Corresponding author: LIANG Li-qun. E-mail: 11q-1019@163.com