

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.01250

牙鲆酵母双杂交 cDNA 文库的构建及文库质量鉴定

杨长庚^{1,2}, 刘姗姗², 孙冰², 陈松林²

1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 农业部海洋渔业可持续发展综合性重点实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 为了研究牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)免疫及抗病相关蛋白和大分子物质的功能及相互作用机制, 构建了牙鲆酵母双杂交 cDNA 文库。原始文库滴度为 1.6×10^6 CFU/mL, 随机选取单克隆菌落进行 PCR 扩增, 根据 PCR 扩增结果表明插入片段大部分大于 500 bp, 平均长度约为 1.5 kb, 随机调取了 115 个 EST 进行了序列测定。扩增后放大文库库容约为 1.8×10^{12} CFU。转化酵母后, 文库转化效率为 3.6×10^5 CFU/ μ g, 文库库容为 5.4×10^6 CFU。牙鲆酵母双杂交文库的构建成功为鲆鲽类免疫机理的研究, 尤其是信号分子通路研究提供有效的工具。

关键词: 牙鲆; 酵母双杂交; 免疫相关基因; 信号通路

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)06-1250-09

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)在中国俗称牙片、偏口、比目鱼, 是名贵海产鱼类, 又是重要的海水增养殖鱼类之一。但是近 30 年来, 由于过量捕捞和环境污染造成自然资源大幅度下降, 因而, 牙鲆养殖业在中国得到蓬勃发展, 但由于高密度集约化养殖的较快发展, 牙鲆疾病日趋严重已成为制约牙鲆养殖业发展的重大障碍^[1]。因此, 研究牙鲆免疫、抗病机理, 采用现代生物技术手段培育抗病力强、生长速度快的牙鲆新品种, 已成为中国水产科技领域亟待解决的问题, 也是解决牙鲆病害的根本途径。

近年来, 国内外在牙鲆抗病机理及抗病育种研究中已取得了一定进展, 刁菁等^[2]对牙鲆靶器官上淋巴囊肿病毒结合蛋白进行鉴定, 推测出有可能是病毒受体蛋白的 3 种病毒结合蛋白; 陈松林等^[3]通过自然选择和人工感染途径筛选出抗鳃弧菌病牙鲆鱼, 建立了牙鲆抗病群体; Nam 等^[4-5]构建了牙鲆的 cDNA 文库, 以期得到更多与牙鲆

抗病相关的基因信息。此外, 还发现了多个与牙鲆抗病相关的基因, 例如张玉喜等^[6]分析了牙鲆抗病鱼和不抗病鱼的 MHC 基因多态性, 初步筛选到抗病相关的 MHC 基因型。Kurobe 等^[7]利用牙鲆肾细胞 cDNA 芯片, 找到了多个与牙鲆免疫相关的基因, 并对其表达模式进行了研究, 又如细胞色素 IL-1 β 被证明是牙鲆中一种重要的免疫相关蛋白, 它能够引起牙鲆中多种免疫相关基因的表达改变^[8]。Dumrongphol 等^[9]通过分析感病牙鲆的 cDNA 芯片数据, 找到了几个新的未知基因可能与牙鲆抗病相关。此外, 牙鲆中 NF- κ B 信号通路中的一些基因也被克隆和研究, 例如 Toll-like 受体家族^[10-11], IRF 家族等^[12-13]。

酵母双杂交系统是研究蛋白质与蛋白质、蛋白质与 RNA, 蛋白质与小分子物质等相互作用的有用技术, 通过建立牙鲆免疫器官——肝、脾、肾混合的酵母双杂交 cDNA 文库, 并与构建合适的诱饵质粒载体等技术相结合, 将可以实现筛选

收稿日期: 2011-03-08; 修订日期: 2011-05-16.

基金项目: 国家 973 计划资助项目(2010CB126303); 公益性农业行业科研专项(200903046); 山东省泰山学者工程专项.

作者简介: 杨长庚(1980-), 男, 博士, 主要从事细胞生物学研究. E-mail: yangcg910@163.com

通信作者: 陈松林, 研究员, 博士生导师. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

与诱饵蛋白相互作用的一个或一组蛋白质。研究它们之间的相互作用关系, 对于研究牙鲆免疫及抗病相关蛋白和大分子物质的功能及蛋白间相互作用具有十分重要的意义。同时, 能为牙鲆抗病机理及抗病育种研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用鱼 试验用健康牙鲆取自海阳市黄海水产公司养殖场, 平均体长约 30 cm, 平均体质量约 200 g, 在海水中暂养 2 d。

1.1.2 试剂 RNA 提取试剂购自 Invitrogen; mRNA 纯化试剂盒 Oligotex-dT₃₀ super mRNA purification Kit, 购自 TaKaRa 公司; AccuScript High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit, *E.coli* DNA Polymerase I, *Pfu* DNA Polymerase 均购自 Stratagene 公司; CHROMA SPIN™ Columns 购自 clontech 公司。Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System 购自 Clontech 公司

1.1.3 菌株及质粒 菌株 DH10B, 载体 pGADT7 质粒, 酵母 Y₂H Gold 均购自 Clontech 公司。

1.2 方法

1.2.1 牙鲆免疫器官总 RNA 的提取 取出牙鲆完整的肝、脾、肾组织, 置于液氮中备用。总 RNA 提取按照 Invitrogen 公司 RNA 提取试剂盒说明进行操作。提取的总 RNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。分别在 260 nm 和 280 nm 的紫外光下检测其吸光值计算 RNA 浓度。组织 mRNA 的分离严格按照 Oligotex-dT₃₀ super mRNA purification Kit 说明进行。

1.2.2 cDNA 的合成及纯化

(1) 第 1 链的合成

按 Stratagene 公司 AccuScript High Fidelity 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书的操作进行第一链 cDNA 合成。

(2) 第 2 链的合成

在 1st Strand cDNA 合成液(25 μL)中加入以下反应试剂进行 2nd Strand cDNA 的合成反应(反应液全量 100 μL): 10×2nd Strand Buffer 10 μL, 2nd

Strand dNTP Mixture 3 μL, RNase-free H₂O 55.5 μL, *E.coli* RNase H(1.5 U/μL) 1 μL, *E.coli* DNA Polymerase I (9 U/μL) 5.5 μL。轻轻混匀后, 16℃反应 2.5 h, 然后置于冰中。再依次加入 Blunting dNTP mix 11.5 μL, cloned *Pfu* DNA polymerase (2.5 U/μL) 1 μL, 72℃加热 28 min(不超过 30 min) 室温放置 5 min。

1.2.3 cDNA 分离与回收 经过末端补平和加接头以及 *Xho*I 酶切消化后的 cDNA 需要进行分级分离。纯化方法按照 BD CHROMA SPIN™-400 Columns(Clontech 公司)说明书进行。

1.2.4 cDNA 与载体连接 冰上预冷的灭菌离心管中依次加入: cDNA 3 μL(约 100 ng)、pGADT7(100 ng/μL)1 μL、Solution I(TaKaRa, Ligase Kit Ver2.0)4 μL。总体积 12 μL。轻混合后 12℃过夜反应。-20℃保存。

1.2.5 大肠杆菌 DH10B 菌株及酵母 Y₂H Gold 菌株的转化 连接产物按 20 kV、200 Ω、25 μF 条件电击转化 DH10B 感受态中, 37℃过夜培养, 取 0.5 μL 连接产物转化 DH10B 感受态进行质量鉴定, 将剩余连接产物进行一百万倍扩增, 提取扩增文库质粒, 按 Yeast maker™ Yeast Transformation System 2 User Manual 步骤转化 15 μg 文库质粒至酵母 Y₂H Gold 菌株中。

1.2.6 cDNA 文库的鉴定 文库滴度测定: 取 200 μL 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℃过夜培养, 然后计算每个平板上的克隆数。文库滴度=菌落数×稀释倍数/涂布菌体体积。

插入片段检测: 用灭菌处理过的牙签在 30 g/mL 的氯霉素 LB 平板上, 随意挑取若干克隆用 T3/T7 引物进行 PCR 扩增反应, 反应条件为: 95℃, 1 min; 94℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 3 min, 35 个循环; 72℃, 10 min。扩增后 1% Agarose Gel, 检测插入 DNA 的片段长度。

1.2.7 酵母双杂文库的质量鉴定 取 100 μL 转化酵母后文库的反应液按 1/100 和 1/1 000 稀释, 分别涂 100 μL 稀释液至 100 mm SD/-Leu 平板,

30℃ 培养, 计数生长克隆数。计算转化效率的公式: 平板上的单克隆数 $\times$ 反应液体积 $\times$ 稀释倍数 $\div$ 涂布体积 $\times$ 转化质粒数。容量的计算公式: 转化效率 $\times$ 转化质粒数

用含 25 % 甘油的 YPD 冷冻培养基将所有 SD/-Leu 平板上的转化子克隆悬浮、合并, 用血球计数板测细胞浓度。取 100 μ L 文库混合液, 按 1/100 和 1/1 000、1/10 000 稀释, 分别涂 100 μ L 稀释液至 100 mm SD/-Leu 平板, 计算克隆数, 计算滴度。

1.2.8 ESTs 序列测定和初步分析 使用 Phred 软件去除低质量序列(<100 bp), Phd2fasta 软件生成序列文件, 再用 Cross-match 软件去除载体和其他污染序列, 最后用 Phrap 软件对序列进行拼接并使用 Consed 软件做人工检查和校正。用 BLASTx 程序将 EST 序列与 NCBI 的非冗余蛋白序列数据库(nr)进行比较。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, 并对单基因簇按功能进行分类。

2 结果与分析

2.1 牙鲆免疫器官总 RNA 提取

采用 Invitrogen RNA 提取试剂法提取的牙鲆免疫器官总 RNA, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 可见清晰的 28S 和 18S 两条 RNA 条带(图 1), 28S RNA 与 18S RNA 2 条带的亮度比接近 2:1, 另有一亮度较弱的 5S RNA 条带, A_{260}/A_{280} 值为 1.94。说明所提取的总 RNA 具有较好的纯度和完整性。可用于 cDNA 的合成。

2.2 牙鲆免疫器官 mRNA 分离与反转录

牙鲆免疫器官总 RNA 混合后测定其浓度, 取适量总 RNA 和一定量的磁珠, 分离总 RNA 中的 mRNA, 纯化后的 mRNA 在反转录酶和 DNA 聚合酶作用下分别得到一链和二链的 cDNA。经电泳分析, 合成的 cDNA 大小在 0.25~3 kb。在 cDNA 片段的两端加入接头后酶切。酶切产物使用 CHROMA SPIN 凝胶过滤柱除去短链 cDNA, 去除小于 500 bp 的 cDNA 片段(图 2), 电泳结果表明片断符合构建文库的要求, 可以进行后续试验。

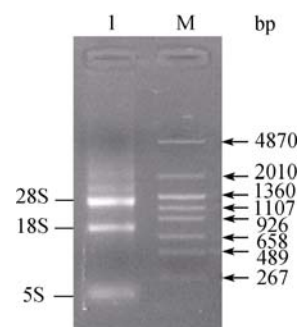


图1 牙鲆肝脾肾总RNA提取

1: 牙鲆肝脾肾总RNA; M: DNA Marker.

Fig.1 The total RNA isolated from liver, spleen and kidney of *Paralichthys olivaceus*

1: total RNA of *P. olivaceus*, M: Lambda EcoT14I digest (TaKaRa),

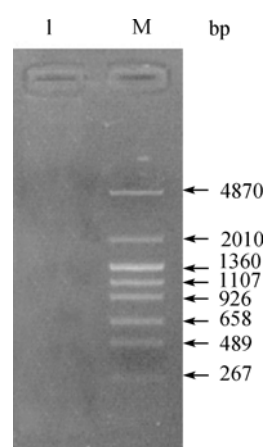


图2 使用CHROMA SPIN除去短链cDNA

1: cDNA过柱后结果; M: DNA Marker.

Fig.2 cDNA size fractionation by CHROMA SPIN

1: cDNA size fractionation, M1: Lambda EcoT14I digest

2.3 文库质量鉴定

取 1 μ L 细胞转化液稀释一定倍数后, 各取 10 μ L 稀释过的菌液涂布, 37℃ 培养过夜后, 计算克隆总数, 测得 cDNA 文库的原始库容量为约 1.6×10^6 CFU, 初级文库甘油保存液滴度约为 2.3×10^4 CFU/mL, 共 1.8 mol。扩增放大文库库容约为 1.8×10^{12} CFU。随机选取单克隆菌落以 pGADT7_F Primer: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3'和 pGADT7_R Primer: 5'-AGA TGG TGC ACG ATG CAC AG-3'引物进行扩增, 根据 PCR 扩增结果表明插入片段大部分大于 500 bp, 平均长度约为 1.5 kb(图 3)。转化酵母后, 在 1/100 和 1/1 000 稀释度的直径为 100 mm 的 SD/-Leu 平板上, 分别得到 550 个、53 个单克隆,

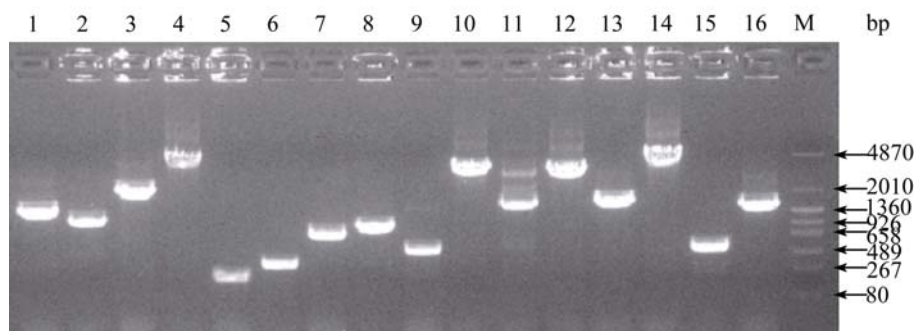


图3 牙鲆肝脾肾酵母双杂交cDNA文库的PCR扩增产物电泳图

M: DNA Marker, 1-16: 随机选取的初级cDNA文库中16个克隆的PCR产物

Fig. 3 Identification of cDNA library from liver, spleen and kidney of *P. olivaceus*

M: DNA marker, 1-16: PCR products of 16 clones from primary cDNA library

取平均值, 经计算得文库转化效率为 3.6×10^5 CFU/ μ g, 文库库容为 5.4×10^6 CFU。

2.4 EST 测序及分析

随机调取了 115 个克隆进行 EST 序列测序分析, 其中 20 个(17.4%)基因无法找到与之匹配的序列, 13 个(11.3%)序列属于功能未知的基因, 与蛋白表达相关的基因有 27 个(23.5%), 与防御相关的基因有 19 个(16.5%), 与代谢相关的基因也有 19 个(16.5%), 6 个(5.2%)基因与细胞信号转导相关, 4 个(3.5%)基因与血红蛋白相关, 此外还有 7 个(6.1%)基因, 由于信息较少, 或者与免疫相关性不强因此没有进行进一步的分类。结果见表 1。

3 讨论

3.1 牙鲆 cDNA 文库的构建与质量测定

CLONTECH 公司 SMART 文库构建指标: 未扩增文库的库容大于 1×10^6 CFU, 扩增后文库的容量大于 1×10^{10} CFU, 重组率大于 85%。本研究中 RNA 电泳结果表明, 提取的 RNA 完整性较好, 得到的初级库容量为 1.60×10^6 CFU, 扩增后文库的容量 1.80×10^{12} CFU, 重组率为 87.5%, 表明所构建的 cDNA 文库质量符合 CLONTECH 公司 SMART 文库构建指标的要求。PCR 随机检测插入片段及 EST 随机测序结果均表明插入片段大部分均大于 500 bp, 平均长度 1.5 kb, 完全满足之后的基因筛选需要。

3.2 牙鲆 cDNA 文库中免疫防御基因分析

对牙鲆 cDNA 文库进行了 EST 随机测序, 获得

了与免疫防御机制相关的基因 19 个, 分为以下几类:

白介素 3(IL-3) 由多种细胞产生并作用于多种细胞的一类细胞因子。缩写为 IL。关于免疫反应的表达和调节, 有来源于淋巴细胞或巨噬细胞等许多因子参与。其中 IL-3 又称多能集落刺激因子(multi-csf), 生物学活性多种多样, 最主要的是对造血干细胞的作用。

Hepcidin 又称 LEAP-1 (liver-expressed antimicrobial peptide)是肝特异性表达的一种小分子抗菌肽, 是铁代谢的负调节激素。与炎症性贫血、遗传性血色沉着病等疾病的发病机制密切相关。Hepcidin 具有广谱抗菌活性, 与固有免疫密切相关^[16]。

转铁蛋白(transferrin) 由 Holmberg 和 Laur- ell 首次在人血清中发现, 由于转铁蛋白具有螯合铁的能力, 而铁是许多细菌和病毒生长的重要因子, 因此转铁蛋白可抑制细菌的生长, 因而转铁蛋白具有较全面的蛋白质生理功能^[17]。

主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) 是脊椎动物的高度多态性基因群。它早期源于解释器官移植中受体排斥供体组织细胞的现象。众多的研究均揭示了 MHC 不同的基因型和分子结构在抗病过程中的重要性^[18]。

血凝集素(serum lectin) 属于糖蛋白, 能够与糖和糖蛋白结合, 被认为是集体自然防御机制中重要的识别分子和免疫监测分子^[19]。但是其在鱼类中的研究尚属于起步阶段。

表 1 EST 序列的比对分析结果
Tab. 1 Number of analyzed cDNA clustered sequences and ESTs

编号 clone no.	基因 gene	物种 closest species	相似性/% identitiy
蛋白表达 protein expression			
A05	60S 酸性核糖体磷酸蛋白 p1 基因 mRNA for 60S acidic ribosomal protein P1 (rplP1 gene)	川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	93
A07(2)*	40S 核糖体蛋白 S11 mRNA 40S ribosomal protein S11 mRNA	大眼鲮 <i>Stizostedion vitreum</i>	94
A11	60S 酸性核糖体蛋白 P1 mRNA mRNA for 60S acidic ribosomal protein P1	川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	93
A12	C409 40S 核糖体蛋白 S2mRNA 克隆 C409 40S ribosomal protein S2 mRNA	鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	95
B08	L32 核糖体蛋白 L32 mRNA RPL32 mRNA for ribosomal protein	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	95
B09	L10a 核糖体蛋白 L10a mRNA RPL10a mRNA for ribosomal protein	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	98
H11(2)	核糖体蛋白 L41 mRNA RPL41 mRNA for ribosomal protein L41	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	81
AD1(2)	40S 核糖体蛋白 S27 mRNA for 40S ribosomal protein S27	川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	96
AD13	核糖体蛋白 Lp2 mRNA ribosomal protein large P2 mRNA	牙鲮 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
AD15(3)	核糖体蛋白 L21 mRNA RPL21 mRNA for ribosomal protein L21	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	97
AD33	rpSa mRNA for ribosomal protein Sa 核糖体蛋白 Sa mRNA	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	87
AD5	ribosomal protein L18 mRNA 核糖体蛋白 L18 mRNA	真鲷 <i>Pagrus major</i>	94
A01(2)	mRNA for 60S ribosomal protein L27A 60S 核糖体蛋白 L27A mRNA	川鲮 <i>Platichthys flesus</i>	98
A11	40S ribosomal protein Sa-like protein mRNA 类似 40S 核糖体蛋白 Sa 的 mRNA	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	98
B05	ribosomal protein L18 mRNA 核糖体蛋白 L18 mRNA	真鲷 <i>Pagrus major</i>	94
G06	ribosomal protein large P2 mRNA 核糖体蛋白 Lp2 mRNA	牙鲮 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
H10	clone afim-evh-505-026 40S ribosomal protein	银鲳 <i>Anoplopoma fimbria</i>	95
H07	rpS6 mRNA for ribosomal protein S6 核糖体蛋白 S6	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	98
C05	60S ribosomal protein L7a putative mRNA 60S 核糖体蛋白 L7a 假定 mRNA	银鲳 <i>Anoplopoma fimbria</i>	99
D07	rpS12 mRNA for ribosomal protein S12 核糖体蛋白 S12 mRNA	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	97
B11	rpS16 mRNA for ribosomal protein S16 核糖体蛋白 S16 mRNA	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	94
细胞防御/免疫 cell defense/immunity			
H08(2)	IL-3 免疫球蛋白轻链克隆 clone IL-3 immunoglobulin light chain	鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	95
C02	免疫球蛋白轻链 mRNA immunoglobulin light chain mRNA	大菱鲆 <i>Psetta maxima</i>	89

续表 1 Tab.1 continued

编号 clone no.	基因 gene	物种 closest species	相似性/% identitiy
C06(9)	hepcidin precursor type II mRNA II 型铁调素前体 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	100
B09	transferrin mRNA 转铁蛋白 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
A09	DNA, contains MHC class Ia chain, clone 含 MHC Ia 链的 DNA 克隆	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
H03	serum lectin isoform 3 mRNA 碘血清凝集素 3 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
H04	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase mRNA 磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶 Mrna	蓝鳍金枪鱼 <i>Thunnus maccoyii</i>	91
B09	Ca ²⁺ -dependent complex C1R/C1S subunit mRNA 钙依赖混合体C1R/C1S亚基mRNA	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	75
D01	TPA_inf: partial mRNA for putative ISG12 protein 假定 ISG12 蛋白的部分 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	82
D04	mRNA for TBT-binding protein 结合三丁基锡蛋白的 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	77
代谢 metabolism			
A10(3)	mRNA for apolipoprotein AI precursor 载脂蛋白 AI 前体 mRNA	川鲈 <i>Platichthys flesus</i>	99
C10	apolipoprotein A1 mRNA 载脂蛋白 A1 mRNA	底鳉 <i>Fundulus heteroclitus</i>	100
H01(2)	mRNA for chymotrypsinogen 2, complete cds 胰凝乳蛋白酶原 2 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
B10(2)	mRNA for elastase 1 precursor 弹性蛋白酶 1 前体 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	96
C09	mRNA for elastase 3 precursor 弹性蛋白酶 3 前体 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	75
H07	mRNA for elastase 4 precursor 弹性蛋白酶 4 前体 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	100
E04	clone afim-evh-517-318 Ubiquitin putative Mrna 泛素	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	97
AD10(4)	mRNA for trypsinogen 3 胰蛋白酶原 3 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	94
H08(2)	mRNA for trypsinogen 2 胰蛋白酶原 2 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	99
H06	trypsinogen 1 precursor 胰蛋白酶原 1	石鲈 <i>Pleuronectes americanus</i>	99
E08	CPA1 mRNA for carboxypeptidase A1 羧肽酶 A1 mRNA	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	100
血红蛋白 hemoglobin			
E07(3)	clone C4_2 hemoglobin beta-A chain mRNA 血红蛋白 beta-A 链 mRNA 克隆 C4_2	鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	77
D02	clone C4_2 hemoglobin beta-A chain mRNA 血红蛋白 beta-A 链 mRNA 克隆 C4_2	鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	76
细胞信号/通讯 cell signaling/ communication			
H06	calmodulin (CAL1) mRNA, complete cds 钙调蛋白 mRNA	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	91
C08	gaba receptor protein mRNA γ -氨基丁酸受体蛋白 mRNA	真鲷 <i>Pagrus major</i>	79

续表 1 Tab.1 continued

编号 clone no.	基因 gene	物种 closest species	相似性/% identity
AD16(2)	translationally controlled tumor protein (TCTP) mRNA 翻译控制肿瘤蛋白 mRNA	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	84
D09	mitochondrial Cyt- <i>b</i> gene for cytochrome 线粒体细胞色素 <i>b</i> 基因	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	92
E05	clone afim-evh-017-221 14 kD phosphohistidine phosphatase mRNA 磷酸组氨酸磷酸酶 mRNA 克隆 afim-evh-017-221 14 kD	银鲆 <i>Anoplopoma fimbria</i>	51
其他 others			
A03	nascent polypeptide-associated complex subunit 初期的多肽相关的复合体亚基	黄金鲈 <i>Perca flavescens</i>	93
A07	high choriolytic enzyme 1 高绒毛膜酶 1	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	86
C09(2)	clone afim-evh-502-159 Low choriolytic enzyme precursor 低绒毛膜酶前体克隆 afim-evh-502-159	银鲆 <i>Anoplopoma fimbria</i>	76
A01	none/beta-2 microglobulin isoform b2m-1 无/beta-2 微球蛋白同型 b2m-1	银鲆 <i>Anoplopoma fimbria</i>	53
H04	clone ssal-rgf-535-149 DNA polymerase delta catalytic subunit mRNA DNA 聚合酶催化剂亚基 mRNA 克隆 ssal-rgf-535-149	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	87
C04	clone afim-evh-510-186 Cornifelin putative 假定的角化蛋白克隆 afim-evh-510-186	银鲆 <i>Anoplopoma fimbria</i>	40
未知 unknown			
H02	contig 7 unknown mRNA	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	77
C03	unknown cDNA	黑斑河鲀 <i>Tetraodon nigroviridis</i>	98
B12	clone lithmor816 mRNA sequence	细条石颌鲷 <i>Lithognathus mormyrus</i>	98
B11	all_halibut.64.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	99
D08	all_halibut.1125.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	99
C06(2)	all_halibut.2511.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	87
C07	all_halibut.66.C10 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	95
E03(2)	all_halibut.1209.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	99
C11	all_halibut.2302.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	92
D01	all_halibut.692.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	96
A02	all_halibut.644.C1 mRNA sequence	大西洋鳕 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	80
C11(20)	none		

注: 括号中的数字表示与该基因具有相同序列比对结果的克隆数.

Note: The number in parentheses represents that the gene has the same number of clones on the results of alignment.

磷脂氢谷胱甘肽过氧化物酶(phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase) 动物体内的过氧化物酶(POD)等可清除自由基的酶类所构成的保护酶系统对生物体适应外界环境, 保护机体免受损伤等发挥重要的调节功能。

补体(C1R/C1S) 补体系统也是鱼类抵抗微生物感染的重要机制之一。与高等脊椎动物相同, 有些鱼类补体的生物学活性主要显示于以下两方面:由替代途径即抗体非依赖性途径或经典途径即抗体依赖性途径激活的细胞溶解作用;由被激活的补体成分释放的片段所行使的调理作用^[20]。

干扰素刺激基因(ISG) 干扰素(IFN)通过诱导细胞表达多种蛋白质而发挥多种生物学功能, 表达这些功能蛋白的基因称作干扰素刺激基因(INF stimulated genes, ISGs), α/β -INF 与 γ -INF 与各自的受体结合, 通过不同信号转换途径, 激活自己的一套 ISG 表达, IFN 作用信号在细胞内的转换和 ISGs 的表达调控及其产物的生物功能是 IFN 机制研究的核心内容。

3.3 酵母双杂交文库构建的意义

生物体系的运作与蛋白质之间的互相作用密不可分, 酵母双杂交技术酵母双杂交由 Fields^[21]在 1989 年提出。作为发现和研究在活细胞体内的蛋白质与蛋白质之间的相互作用的技术平台, 经过不断的完善和发展, 不但可以检测已知蛋白质之间的相互作用, 更重要的在于发现新的与已知蛋白相互作用的未知蛋白。

本实验采用 Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid System 构建了酵母双杂交文库, 这个系统采用了一个新的酵母菌株 (Y₂H Gold), 该菌株含有 Aureobasidin A 抗性报告基因, 适用于高水平表达的载体及文库筛选。且该系统基于 4 个可选择的报告基因, 可有效降低假阳性。

目前, 对于鱼类免疫的研究主要集中于基因组学和部分基因功能的研究与验证, 多是通过构建牙鲆受到不同感染后的全长 cDNA 文库或者基因芯片的方法找到与牙鲆免疫相关的基因, 并在转录水平上研究其表达变化规律^[7, 22-23]。但是仅仅了解部分基因的变化规律, 并不能够真正的揭

示牙鲆免疫过程所涉及到的信号通路中各个基因的关系, 同时对于完善信号通路, 寻找信号通路中新成员等问题也帮助不大。为了更好的研究牙鲆中与免疫相关的关键因子及其作用, 寻找新的免疫相关蛋白, 完善牙鲆免疫信号通路, 我们构建了牙鲆肝脾肾的酵母双杂交文库。

通过牙鲆酵母双杂交文库的构建, 一方面可以通过文库的 EST 测序, 丰富牙鲆基因数据库, 为利用同源序列设计引物或者探针调取 cDNA 全长序列提供便利条件, 另一方面, 为今后通过酵母双杂交的方法找到与免疫相关因子相互作用的蛋白提供基础, 从而进一步加深对牙鲆免疫的认识, 完善牙鲆免疫信号传导途径提供保障。牙鲆酵母双杂交文库的成功构建将会与本实验室已经具有的大菱鲆全长 cDNA 文库及其表达谱结果相互比较, 互为参照, 为今后鲆鲽类免疫相关研究, 筛选具有抗病能力的鲆鲽类硬骨鱼等实际应用提供理论基础和物质保障。

参考文献:

- [1] 周丽, 宫庆礼. 牙鲆的疾病 [J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27: 173-180.
- [2] 刁菁, 战文斌, 绳秀珍. 牙鲆淋巴囊肿病毒靶器官上病毒结合蛋白的鉴定 [J]. 中国海洋大学学报, 2009, 39: 913-918.
- [3] 陈松林, 田永胜, 徐田军, 等. 牙鲆抗病群体和家系的建立及其生长和抗病性能初步测定 [J]. 水产学报, 2008, 32: 665-671.
- [4] Nam B-H, Hirono I, Aoki T. Bulk isolation of immune response-related genes by expressed sequenced tags of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes stimulated with Con A/PMA [J]. Fish Shellfish Immunol, 2003, 14: 467-476.
- [5] Nam B-H, Yamamoto E, Hirono I, et al. A survey of expressed genes in the leukocytes of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with Hirame rhabdovirus [J]. Dev Comp Immunol, 2000, 24: 13-24.
- [6] 张玉喜, 陈松林. 牙鲆 MHCIIb 基因多态性及其与鱼体抗病力关系的研究 [J]. 水产学报, 2006, 30: 633-639.
- [7] Kurobe T, Yasuike M, Kimura T, et al. Expression profiling of immune-related genes from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells using cDNA microarrays [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29: 515-523.

- [8] Emmadi D, Iwahori A, Hirono I, et al. cDNA microarray analysis of interleukin- 1β -induced Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* kidney cells [J]. Fish Sci, 2005, 71: 519–530.
- [9] Dumrongphol Y, Hirota T, Kondo H, et al. Identification of novel genes in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) head kidney up-regulated after vaccination with *Streptococcus iniae* formalin-killed cells [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26: 197–200.
- [10] Hwang S D, Asahi T, Kondo H, et al. Molecular cloning and expression study on Toll-like receptor 5 paralogs in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29: 630–638.
- [11] Hwang S D, Kondo H, Hirono I, et al. Molecular cloning and characterization of Toll-like receptor 14 in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 44: 1845–1853.
- [12] Hu G, Yin X, Lou H, et al. Interferon regulatory factor 3 (IRF-3) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*: Sequencing, limited tissue distribution, inducible expression and induction of fish type I interferon promoter [J]. Dev Comp Immunol, 2011, 35: 164–173.
- [13] Hu G, Yin X, Xia J, et al. Molecular cloning and characterization of interferon regulatory factor 7 (IRF-7) in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 29: 963–971.
- [14] Chen S L, Li W, Meng L, et al. Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2007, 22: 172–181.
- [15] Chen S L, Xu M Y, Ji X S, et al. Cloning, Characterization, and Expression Analysis of Hepcidin Gene from Red Sea Bream (*Chrysophrys major*) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 1608–1612.
- [16] Cuesta A, Meseguer J, Esteban M Á. The antimicrobial peptide hepcidin exerts an important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream [J]. Mol Immunol, 2008, 45: 2333–2342.
- [17] Aisen P and Listowsky I. Iron Transport and Storage Proteins [J]. Annu Rev Biochem, 1980, 49: 357–393.
- [18] Larruskain A, Minguijón E, García-Etxebarria K, et al. MHC class II *DRB1* gene polymorphism in the pathogenesis of Maedi-Visna and pulmonary adenocarcinoma viral diseases in sheep [J]. Immunogenetics, 2010, 62: 75–83.
- [19] Drickamer K and Taylor M E. Evolving views of protein glycosylation [J]. Trends Biochem Sci, 1998, 23: 321–324.
- [20] Yano T. The Complement Systems of Fish [J]. Fish Pathol, 1995, 30: 151–158.
- [21] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. Nature, 1989, 340: 245–246.
- [22] Kono T, Sakai M. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with the immunostimulant peptidoglycan [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11: 357–366.
- [23] Tanekhy M, Matsuda S, Itano T, et al. Expression of cytokine genes in head kidney and spleen cells of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with *Nocardia seriolae* [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2010, 134: 178–183.

Construction and identification of a *Paralichthys olivaceus* yeast two-hybrid library

YANG Changgeng^{1,2}, LIU Shanshan², SUN Bing², CHENG Songlin²

1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: A yeast two-hybrid cDNA library of flounder (*Paralichthys olivaceus*) was constructed to investigate the function of immune-related proteins and to gain insight into their mechanisms of interaction. The titer of this original library was 1.6×10^6 CFU/ml. Most of the fragments PCR-amplified from single colonies were larger than 500 bp, with an average length of 1.5 kb. We randomly selected and sequenced 115 expressed sequence tags. The capacity of the amplified library was approximately 1.8×10^{12} CFU. After transformation into yeast cells, the transformation efficiency was 3.6×10^5 CFU/ μ g, and the capacity was 5.4×10^6 CFU. The successful construction of this yeast two-hybrid library provides an effective tool to elucidate mechanisms of immunity, especially signaling pathways, in this flounder species.

Key words: *Paralichthys olivaceus*; yeast two-hybrid; immune-related genes; signaling pathway

Corresponding author: CHEN Songlin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn