

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2013.00243

## 脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库的构建及 EST 序列分析

段亚飞<sup>1,2</sup>, 刘萍<sup>2</sup>, 李吉涛<sup>2</sup>, 李健<sup>2</sup>, 陈萍<sup>2</sup>

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

**摘要:** 采用 SMART 技术(Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript)构建了脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)血细胞全长 cDNA 文库。结果表明: cDNA 初级文库滴度为  $2.8 \times 10^6$  pfu/mL, 重组率达 99% 以上, 插入片段在 400~2 000 bp; 扩增文库滴度为  $4.3 \times 10^9$  pfu/mL。随机挑取 100 个单克隆进行测序, 得到 95 条平均长度为 493 bp 的高质量 EST 序列, 序列拼接获得 70 条 unigenes, 包括 11 条 contigs 和 59 条 singletons。Blast 同源比对发现, 其中 20 条 unigenes 与数据库中已知基因同源性较高, 2 条为未知基因, 48 条未知序列。通过同源性比较筛选出多个与生长、代谢、免疫等相关的功能基因, 如肌钙蛋白、烯醇酶、抗脂多糖因子、溶菌酶等基因。结果证实, 所构建的脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库质量较高, 可在短期内获得大量脊尾白虾血细胞组织的功能基因表达信息。本研究旨在为脊尾白虾功能基因的发掘和分子标记的筛选提供素材。

**关键词:** 脊尾白虾; 血细胞; cDNA 文库; EST; 序列分析

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2013)02-0243-07

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*), 隶属于节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda)、游泳亚目(Natantia)、长臂虾科(Palaemonidae)、白虾属, 是中国黄、渤海地区重要的经济虾类<sup>[1-2]</sup>。因其繁殖能力强、生长速度快、环境适应性强等优点<sup>[3]</sup>, 近年来脊尾白虾的饲养面积得到迅速扩大。目前, 关于脊尾白虾的研究主要集中于养殖<sup>[4]</sup>、病害<sup>[5]</sup>、生物学<sup>[6]</sup>、微卫星引物筛选<sup>[7]</sup>和遗传多样性<sup>[3]</sup>等方面, 而关于其功能基因的研究仅有少数报道<sup>[8-9]</sup>。随着脊尾白虾养殖规模的不断扩大, 病害问题亦日渐突出, 近年来不断有混养池塘中脊尾白虾感染疾病而造成经济损失的现象<sup>[5]</sup>。解决这一问题的关键是加强脊尾白虾抗病及免疫机制的研究, 脊尾白虾功能基因的研究能为疾病防治提供理论基础。因此, 脊尾

白虾基因信息的获得显得极为迫切。

cDNA 文库的构建及 EST 分析是目前发现新基因和研究功能基因的有效手段<sup>[10-13]</sup>。EST 是从 cDNA 文库中通过随机挑取单克隆进行单向测序获得的在特定时期表达的基因序列<sup>[13]</sup>。通过 EST 测序, 可以用来识别功能基因<sup>[11-12]</sup>, 开发分子标记(如微卫星、SNP)<sup>[14-16]</sup>, 构建遗传连锁图谱和物理图谱<sup>[17]</sup>, 分析不同组织器官中基因表达模式<sup>[18]</sup>等。

近年来, cDNA 文库的构建及 EST 分析在多种虾类中已有研究报道, 并取得较大的研究进展, 如中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)<sup>[19]</sup>、日本对虾(*Penaeus japonicus*)<sup>[20]</sup>、斑节对虾(*Penaeus monodon*)<sup>[21]</sup>、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)<sup>[10]</sup>和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)<sup>[22]</sup>等, 但脊尾白虾 cDNA 文库构建及 EST 分

收稿日期: 2012-05-11; 修订日期: 2012-06-18.

基金项目: 国家 863 计划资助项目(2012AA10A409); 国家虾产业技术体系项目(CARS-47); 公益性行业(农业)科研专项(201103034); 中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(20603022012021).

作者简介: 段亚飞(1989-), 男, 硕士研究生, 主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: dxfei87@126.com

通信作者: 刘萍, 研究员. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn

析方面的研究尚未见报道。本实验拟通过构建脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库, 并进行 EST 测序分析, 以期在短期内获得大量脊尾白虾血细胞的基因表达信息, 为功能基因的深入研究提供分子依据, 并为良种选育发现分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本实验所用脊尾白虾于 2011 年 11 月采自昌邑市海丰水产养殖有限责任公司, 以内含抗凝剂 (0.45 mol/L NaCl, 0.1 mol/L 葡萄糖, 30 mmol/L 柠檬酸钠, 26 mmol/L 柠檬酸, 10 mmol/L EDTA, pH4.6)<sup>[23]</sup> 的注射器活体采取血液, 离心 (4℃, 800 r/min, 15 min) 收集血细胞沉淀, 立即置于液氮中冷冻保存备用。

### 1.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen, USA) 提取总 RNA, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性, 分光光度计检测其纯度及浓度。使用 mRNA Isolation System III 试剂盒 (Promega, USA) 从血细胞总 RNA 中分离纯化得到 poly A<sup>+</sup> mRNA。

### 1.3 cDNA 文库的构建

按照 SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit (Clontech, USA) 说明书进行。以纯化的 poly A<sup>+</sup> mRNA 为模板, SMART IV Oligonucleotide 和 CDS III/3'PCR Primer 为引物, 在 SMART Scribe<sup>TM</sup> MMLV Reverse Transcriptase 作用下反转录合成 cDNA 第一链; 以 5'PCR Primer 和 CDS III/3'PCR Primer 为引物, 采用 LD-PCR 法合成 cDNA 第二链。双链 cDNA 经蛋白酶 K 消化、SfiI 酶切, 通过 CHROMA SPIN<sup>TM</sup>-400 柱进行分级分离, 去除小于 500 bp 的片段; 处理后的 cDNA 与 λTriplEx2 分别以 1:0.5、1:1、1:1.5 的体积比 16℃ 过夜进行连接反应。连接产物使用 MaxPlax<sup>TM</sup> Lambda Packing Extracts (Epicentre, USA) 进行包装反应, 即为全长 cDNA 初级文库。

### 1.4 cDNA 文库的质量鉴定及扩增

**1.4.1 cDNA 文库滴度及重组率的鉴定** 取 cDNA 初级文库液 1 μL, 用 1×λ 稀释液进行 1:10 (体积

比) 稀释; 取 1 μL 稀释液与 200 μL 10 mmol/L MgSO<sub>4</sub> 重悬的过夜培养的 *E. coli* XL1-Blue 进行混合, 37℃ 温育 15 min; 然后铺 LB/MgSO<sub>4</sub> 平板, 每个比例做 3 个平行, 37℃ 培养 6~18 h, 统计噬菌斑数目, 计算文库滴度。

根据 cDNA 文库滴度, 取适量上述噬菌体稀释液与 *E. coli* XL1-Blue 混合物, 加到含有 IPTG (50 μg/mL) 和 X-gal (50 μg/mL) 的上层琼脂中, 铺 LB/MgSO<sub>4</sub> 平板, 37℃ 培养 6~18 h, 统计蓝、白斑数目, 计算文库重组率。

**1.4.2 cDNA 文库插入片段的鉴定** 随机挑取 10 个阳性噬菌斑, 溶于 100 μL 1×λ 稀释液中, 4℃ 过夜。分别取 5 μL 作为模板, 使用 cDNA 文库构建试剂盒自带的 5'引物和 3'引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其长度大小, 由此判断插入片段的长度。

**1.4.3 cDNA 文库的扩增及保存** 以每板 7×10<sup>4</sup> 克隆数在 150 mm LB/MgSO<sub>4</sub> 平板上进行铺板, 37℃ 培养 6~18 h。待噬菌斑生长至将要融合时, 每板加入 12 mL 1×λ 稀释液, 4℃ 过夜, 形成扩增 cDNA 文库裂解液。50 r/min 室温振摇 1 h, 收集洗脱液, 加入 10 mL 氯仿, 上下振摇 2 min, 然后 7 000 r/min 离心 10 min 去除氯仿, 上清液即为扩增 cDNA 文库。cDNA 文库扩增后进行分装, 分别加入 7% 二甲基亚砜 (DMSO), -80℃ 保存备用。

### 1.5 序列测定与分析

取适量初级 cDNA 文库液转化过夜培养的 *E. coli* BM25.8 感受态细胞, 铺 LB 平板, 31℃ 培养 6~18 h。随机挑取 100 个阳性克隆, 送上海生工测序。采用 5'pTriPLEx2 引物 (5'-CTC CGA GAT CTG GAC GAG C-3') 在 5'端进行单向测序。获得的序列利用 Cross-match 软件进行载体序列、引物序列和低质量序列 (<100 bp) 去除, 经 Phrap 软件进行序列拼接后, 与 NCBI 核苷酸和蛋白质数据库进行 BLAST 同源性比对 (*E*-value<1e-5)。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

利用 Trizol 试剂提取获得脊尾白虾血细胞总

RNA, 经紫外分光光度计检测, 其  $OD_{260}/OD_{280}$  比值为 1.91, 表明总 RNA 纯度较高; 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1A), 18S 和 28S rRNA 条带清晰, 完整性较好, 符合 cDNA 文库建库要求。利用 mRNA Isolation System III 试剂盒分离纯化获得 mRNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1B), 其纯度和质量符合 cDNA 文库构建标准, 可以作为反转录 cDNA 第一链的有效模板, 用于构建 cDNA 文库。

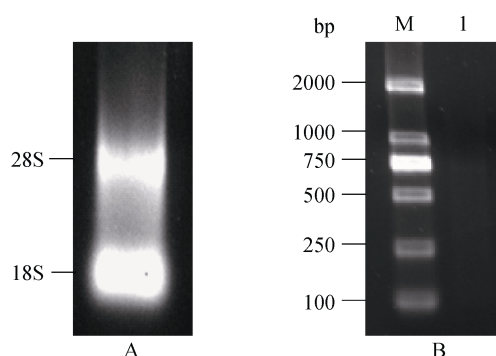


图 1 总 RNA 和 mRNA 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析

M: DL 2000 Marker (bp); A: 总 RNA; B: mRNA.

Fig.1 Analysis of total RNA and mRNA by 1.0% agarose gel electrophoresis

M: DL 2000 Marker (bp); A: total RNA; B: mRNA.

## 2.2 双链 cDNA 的合成

利用 SMART<sup>TM</sup> cDNA 文库构建试剂盒反转录获得 cDNA 第一链, 经 LD-PCR 扩增获得双链 cDNA。1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 双链 cDNA 呈弥散状, 均匀分布于 0.1 ~ 10 kb 之间(图 2), 其分子量大小符合建库标准。

## 2.3 cDNA 片段的分离

利用 CHROMA SPIN<sup>TM</sup>-400 分离柱对获得的

双链 cDNA 进行分级分离, 共获得 16 管分离产物。分别取分离得到的产物 3  $\mu$ L, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 发现从第 6 管开始出现大于 500 bp 的 cDNA 片段, 收集第 6 ~ 9 管, cDNA 片段主要分布于 500 bp 以上(图 3), 可以用于构建 cDNA 文库。

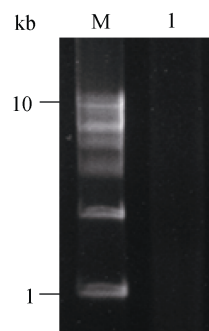


图 2 双链 cDNA 的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析

M: 1kb 分子量标准; 1: 双链 cDNA.

Fig.2 Analysis of double-strand cDNA by 1.0% agarose gel electrophoresis

M: 1kb Maker; 1: double-strand cDNA.

## 2.4 脊尾白虾血细胞 cDNA 文库的构建及质量鉴定

**2.4.1 cDNA 文库滴度及重组率的鉴定** 通过统计平板上的噬菌斑数量, 经计算, 血细胞初始 cDNA 文库滴度为  $2.8 \times 10^6$  pfu/mL; cDNA 文库扩增后, 经检测, 血细胞 cDNA 文库滴度为  $4.3 \times 10^9$  pfu/mL。经 IPTG 和 X-gal 诱导, 统计蓝、白斑数量计算出文库重组率为 99% 以上。

**2.4.2 cDNA 文库插入片段的鉴定** 随机挑选分界良好的阳性噬菌斑 10 个, 用文库构建试剂盒自带 5' 和 3' 引物进行 PCR 鉴定, 结果显示, 插入片段大小主要在 400 ~ 2 000 bp 之间(图 4), 表明本

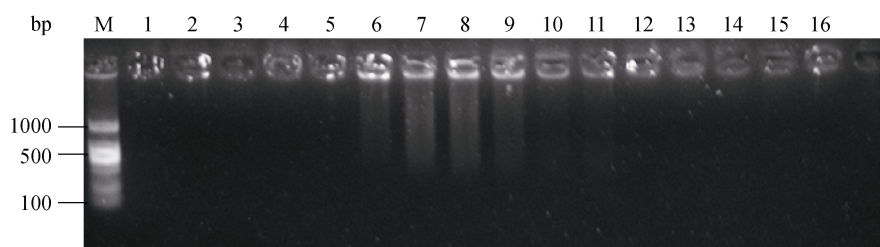


图 3 双链 cDNA 分级分离的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析

M: DL1000 Maker (bp); 1~16: 16 个 cDNA 片段分离产物.

Fig.3 Analysis of double-strand cDNA by 1.0% agarose gel electrophoresis

M: DL1000 Maker (bp); 1~16: 16 products of cDNA size fractionation.

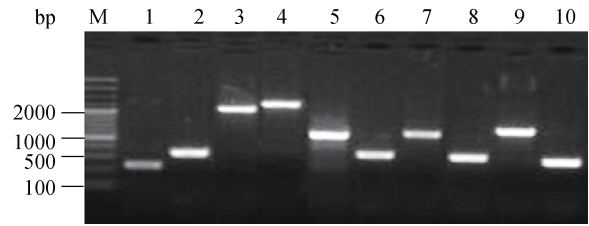


图 4 cDNA 文库的 PCR 扩增结果

M: DL1000 Marker (bp); 1~10: cDNA 文库 10 个噬菌斑 PCR 产物

Fig. 4 Analysis of the cDNA library by PCR amplification

M: DL1000 Marker (bp); 1~10: PCR products of 10 plaques from cDNA library

次试验所构建的脊尾白虾血细胞 cDNA 文库质量较好。

2.5 序列测定与分析

随机挑取 100 个单克隆由上海生工进行测序, 测序结果去除载体序列、引物序列和低质量序列 (<100 bp), 共得到 95 条高质量 EST 序列, 平均长度为 493 bp。95 条 ESTs 经过 Phrap 软件序列聚类拼接, 共获得 70 条 unigenes, 其中包括 11 条重

叠群(contigs)和 59 条单一序列(singlets)。

2.6 EST 序列分析

70 条 unigenes 经过 BLASTn 和 BLASTx 与核苷酸和蛋白质数据库进行同源性比较, 结果表明, 有 20 条 unigenes 与数据库中已知基因具有较高同源性, 2 条 unigenes 显示为未知基因(hypothetical protein), 其余的 48 条 unigenes 未能找到同源序列。通过序列同源性比较, 本研究筛选出多个与生长、代谢、免疫等相关的功能基因, 如肌钙蛋白、烯醇酶、抗脂多糖因子、溶菌酶等, 且大多数在脊尾白虾中为首次报道, 部分序列比对结果见表 1。

3 讨论

自从 1976 年 Hofetetter 等<sup>[24-25]</sup>成功构建第一个 cDNA 文库以来, 构建 cDNA 文库已成为研究功能基因组学的基本手段之一, 目前已经广泛应用于研究不同发育阶段基因表达的变化、某特定

表 1 脊尾白虾血细胞 cDNA 文库部分 Blast 比对结果

Tab. 1 The partial Blast results of cDNA library from *E. carinicauda* haemocyte

| 基因名称<br>gene name                                                                    | 同源物种<br>homologous species    | 同源序列号<br>homologous No. | 期望值<br>E-value |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------|----------------|
| 细胞色素 C 氧化酶 cytochrome c oxidase subunit                                              | <i>E. carinicauda</i>         | ref YP_002808471.1      | 1.00e-113      |
| 40S 核糖体蛋白 40S ribosomal protein S16                                                  | <i>Gallus gallus</i>          | ref XP_416113.1         | 1.00e-65       |
| 18S rRNA 18S rRNA gene                                                               | <i>M. rosenbergii</i>         | gb GU205033.1           | 4.00e-61       |
| 核糖体蛋白 ribosomal protein L14                                                          | <i>Palaemonetes varians</i>   | gb FJ654517.1           | 1.00e-28       |
| 线粒体 mitochondrion                                                                    | <i>E. carinicauda</i>         | gb EF560650.1           | 0.00e+00       |
| 羧肽酶 carboxypeptidase M                                                               | <i>Mus musculus</i>           | gb BC088735.1           | 1.00e-06       |
| 无花果酶 ficolin                                                                         | <i>Rattus norvegicus</i>      | ref NM_031348.2         | 2.00e-10       |
| Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATP 酶 Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase alpha 1 | <i>Taeniopygia guttata</i>    | gb DQ215949.1           | 2.00e-08       |
| H <sup>+</sup> -ATP 酶 ATPase, H <sup>+</sup> transporting                            | <i>Xenopus laevis</i>         | ref NM_001093722.1      | 7.00e-07       |
| 铁蛋白 ferritin                                                                         | <i>M. rosenbergii</i>         | gb EU371046.1           | 0.00e+00       |
| 抗脂多糖因子 anti-lipopolysaccharide factor 2                                              | <i>M. rosenbergii</i>         | gb ADI80707.1           | 5.00e-37       |
| 血蓝蛋白 hemocyanin subunit L                                                            | <i>M. japonicus</i>           | gb ABR14693.1           | 1.00e-132      |
| 热休克蛋白 70 heat shock protein 70                                                       | <i>Poecilia reticulata</i>    | gb EF408831.1           | 3.00e-11       |
| 组织蛋白酶 cathepsin L                                                                    | <i>Pandalus borealis</i>      | dbj BAC65418.1          | 2.00e-64       |
| β-肌动蛋白 β-actin                                                                       | <i>Marsupenaeus japonicus</i> | gb ADG45307.1           | 1.00e-174      |
| 肌球蛋白 myosin VB                                                                       | <i>M. musculus</i>            | gb BC011494.1           | 1.00e-09       |
| 胞裂蛋白 septin 6                                                                        | <i>Danio rerio</i>            | ref NM_212626.1         | 3.00e-07       |
| 烯醇酶 enolase                                                                          | <i>Ovis aries</i>             | gb FJ201248.1           | 2.00e-06       |
| 溶菌酶 lysozyme                                                                         | <i>M. rosenbergii</i>         | gb AY257549.2           | 9.00e-15       |
| 肌钙蛋白 troponin                                                                        | <i>Epinephelus coioides</i>   | gb GU982554.1           | 3.00e-10       |

发育期基因表达情况和分离组织特异性基因等方面<sup>[26-28]</sup>。近年来,多种虾类的血细胞 cDNA 文库得到构建,广泛应用于功能基因的筛选和克隆,如中国对虾<sup>[19]</sup>、日本对虾<sup>[20]</sup>、斑节对虾<sup>[21]</sup>、凡纳滨对虾<sup>[10]</sup>等。通过构建脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库和 EST 随机测序,可以在短期内获得大量血细胞组织的基因表达信息,以期为进一步筛选、克隆新基因提供重要资源。

cDNA 文库的质量,主要从 3 个方面进行评价<sup>[29]</sup>:(1)要有足够的克隆数,能够包含目的序列,保证全长 cDNA 中的每一个序列至少有 1 个拷贝存在于文库中;(2)小片段的 cDNA 插入片段(<500 bp)较少;(3)由近于全长的 mRNA 拷贝 cDNA 插入组成,以便能获得全长基因。本研究采用 SMART 技术成功构建出脊尾白虾血细胞组织全长 cDNA 文库,初级文库滴度为  $2.8 \times 10^6$  pfu/mL,重组效率达到 99%以上;扩增后文库滴度为  $4.3 \times 10^9$  pfu/mL,已超过 cDNA 文库的构建标准。经检测,cDNA 文库的插入片段分布于 400 ~ 2 000 bp,说明文库质量较高,可以进行 EST 随机测序,为基因筛选和克隆奠定物质基础。

本研究对所随机挑取的 100 个阳性克隆进行 EST 测序和序列初步分析,主要侧重于部分 EST 序列的同源比对,以初步检测 cDNA 文库中功能基因的表达情况,为后续大量的 EST 测序及高级分析奠定基础。通过 Blast 同源比对,本研究筛选出多个与生长、代谢、免疫等相关的功能基因,如肌钙蛋白、烯醇酶、抗脂多糖因子、溶菌酶等(表 1),且大多数在脊尾白虾中为首次报道。肌钙蛋白

是横纹肌兴奋收缩的主要调节蛋白,通过其抑制区域与肌动蛋白-原肌球蛋白结合和脱离,从而使肌肉产生舒张和收缩的状态<sup>[30]</sup>,被视为肌肉收缩的分子开关<sup>[31]</sup>。李吉涛等<sup>[32]</sup>通过构建中国对虾肌肉全长 cDNA 文库,筛选得到肌钙蛋白 基因序列。烯醇酶是糖酵解途径中的重要酶类,广泛存在于所有具有无氧酵解功能的有机体中,在 2-磷酸甘油酸向磷酸烯醇式丙酮酸的转化过程中起催化作用。Giallongo 等<sup>[33]</sup>研究表明,烯醇酶是一种比较保守的蛋白。李文兰等<sup>[34]</sup>从凡纳滨对虾生

长性状差减 cDNA 文库中筛选、克隆得到烯醇酶基因,并对其进行序列、进化和表达进行了分析。抗脂多糖因子是近年来在甲壳动物中研究较为广泛的一种抗菌肽,它具有抗菌和脂多糖结合活性,可以调节细胞的脱颗粒作用,并从而引起细胞内一系列的级联反应,在甲壳动物的固有免疫系统中起着重要的作用<sup>[35-36]</sup>,已在多种虾类中得到鉴定和克隆<sup>[37-39]</sup>。溶菌酶作为甲壳动物的非特异性免疫因子之一,依赖其小分子量和溶菌作用,通过水解细菌细胞壁黏多糖的  $\beta$ -1, 4 糖苷键而在机体多种免疫反应中发挥作用<sup>[40]</sup>。本研究通过 EST 分析筛选出多个与脊尾白虾性状相关的功能基因,结果表明本研究构建的血细胞 cDNA 文库功能基因表达量较为丰富,可以进行大量 EST 测序分析,以期筛选出更多的功能基因。

以上结果表明,本研究所构建的全长 cDNA 文库可以用于后续大量 EST 测序及高级分析,可以从文库中筛选获得一些脊尾白虾性状相关的功能基因,为后续脊尾白虾功能基因的大规模克隆和表达分析奠定基础。另外,关于本研究所获得的脊尾白虾 EST 序列,其相关的 SSR 分析也将陆续展开,以期获得丰富的 SSR 分子标记,为该物种的遗传多样性研究奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] 韩俊英,李健,李吉涛,等.脊尾白虾热休克蛋白 HSP90 基因的原核表达与鉴定[J].渔业科学进展,2011,32(5): 44-50.
- [2] 陈卫平.不同温度、盐度下脊尾白虾 *Exopalaemon carinicauda* (Holthuis)早期胚胎和幼体发育的观察研究[J].现代渔业信息,2005,20(5): 23-26.
- [3] 马朋,刘萍,李健,等.脊尾白虾 3 个野生群体线粒体 COI 基因的遗传多样性及系统发育分析[J].渔业科学进展,2011,32(6): 50-56.
- [4] 时冬晴,叶建生.脊尾白虾的生物学特性及健康养殖技术[J].渔业经济研究,2007,5: 40-42.
- [5] Xu W, Xie J, Shi H, et al. Hematodinium infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China[J]. Aquaculture, 2010, 300: 25-31.
- [6] 马牲,董双林,王兴强,等.脊尾白虾生物学及养殖生态学 研究进展[J].齐鲁渔业,2005,22(8): 21-24.
- [7] 贾舒雯,刘萍,韩智科,等.脊尾白虾微卫星富集文库的

- 构建与多态性标记的筛选[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1787–1794.
- [8] 韩俊英, 李健, 李吉涛, 等. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1130–1138.
- [9] Li J, Han J, Chen P, et al. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32: 1191–1197.
- [10] Gross PS, Bartlett TC, Browdy CL. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of haemocytes and hepatopancreas in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic white shrimp, *L. setiferus*[J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25: 565–577.
- [11] Gai Y, Wang L, Zhao J. The construction of a cDNA library enriched for immune genes and the analysis of 7535 ESTs from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 27: 684–694.
- [12] Yang A, Zhou Z, He Ch. Analysis of expressed sequence tags from body wall, intestine and respiratory tree of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Aquaculture, 2009, 296: 193–199.
- [13] Zhao D, Song Sh, Wang Q, et al. Discovery of immune-related genes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by expressed sequence tag analysis of haemocytes[J]. Aquaculture, 2009, 287: 297–303.
- [14] Xu Q, Liu Y, Liu R. Expressed sequence tags from cDNA library prepared from gills of the swimming crab, *Portunus trituberculatus*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2010, 394: 105–115.
- [15] He C, Chen L, Simmons M, et al. Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis[J]. Anim Genet, 2003, 34: 445–448.
- [16] Reusch TB, Veron AS, Preuss C, et al. Comparative analysis of expressed sequence tag (EST) libraries in the seagrass *Zostera marina* subjected to temperature stress[J]. Mar Biotechnol, 2008, 10: 297–309.
- [17] Lu J, Zhao H, Suo N. Genetic linkage maps of *Dendrobium moniliforme* and *D. officinale* based on EST-SSR, SRAP, ISSR and RAPD markers[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 137: 1–10.
- [18] Gueguen Y, Cadoret JP, Flament D. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from haemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*[J]. Gene, 2003, 303: 139–145.
- [19] Dong B, Xiang JH. Discovery of genes involved in defense/immunity functions in a haemocytes cDNA library from *Fenneropenaeus chinensis* by ESTs annotation[J]. Aquaculture, 2007, 272: 208–215.
- [20] Rojtinakorn J, Hirono I, Itami T, et al. Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach[J]. Fish Shellfish Immunol, 2002, 13: 69–83.
- [21] Supungul P, Klinbunga S, Pichyangkura R, et al. Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach[J]. Dis Aquat Org, 2004, 61: 123–135.
- [22] 刘萍, 邱高峰, 郑亮, 等. 罗氏沼虾促雄腺 cDNA 文库的构建及部分表达序列标签的筛选[J]. 上海水产大学学报, 2008, 17(2): 129–133.
- [23] Söderhäll K, Smith VJ. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenas* and other marine decapods[J]. Dev Comp Immunol, 1983(7): 229–239.
- [24] 晏楚君, 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): 1–6.
- [25] 杨成君, 王军. cDNA 文库的构建策略及其应用[J]. 生物技术通报, 2007(1): 5–9.
- [26] 陈奕慧, 李孜, 李涛, 等. 日本血吸虫尾蚴 cDNA 文库的免疫学筛选及 EST 序列的分析[J]. J Trop Med, 2007, 7(1): 46–54.
- [27] 叶波平, 管悦, 许媛媛, 等. 木榄幼苗叶片 cDNA 文库的构建及其表达序列标签分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2010, 18(2): 140–150.
- [28] Pongsomboon S, Wongpanya R, Tang S, et al. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function[J]. Fish Shellfish Immunol, 2008, 25: 485–493.
- [29] 李吉涛, 李健, 陈萍, 等. 中国明对虾“黄海 1 号”血细胞和肌肉 cDNA 文库的构建[J]. 中国水产科学, 2009, 16(5): 781–785.
- [30] 马腾, 周勇志, 向飞宇, 等. 镰形扇头蜆肌钙蛋白 基因的克隆及其分布[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(2): 160–169.
- [31] AfifiN A, El-Sooud K A. Tissue concentration and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens[J]. Brit Poult Sci, 1997, 38: 425–428.
- [32] Li J, Chen P, Li J, et al. Construction of a Muscle cDNA Library of Chinese Shrimp *Fenneropenaeus chinensis* and Sequence Analysis of the Troponin Gene[J]. J Ocean Univ China, 2010, 9(1): 81–86.

- [33] Giallongo A, Feo S, Moore R, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA for human enolase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(18): 6741–6745.
- [34] 李文兰, 高永华, 盛小伟, 等. 凡纳滨对虾烯醇酶基因 *Enolase* 的克隆及表达[J]. 广东农业科学, 2011(5): 168–174.
- [35] Tanaka S, Nakamura T, Morita T, et al. Anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin-mediated activation of coagulation system[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 105: 717–723.
- [36] Somboonwiwat K, Bachère E, Rimphanitchayakit V, et al. Localization of anti-lipopolysaccharide factor (ALFPm3) in tissues of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and characterization of its binding properties[J]. Dev Comp Immunol, 2008, 32: 1170–1176.
- [37] Liu F, Liu Y, Li F, et al. Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*)[J]. Mar Biotechnol, 2005(7): 600–608.
- [38] Nagoshi H, Inagawa H, Morii K, et al. Cloning and characterization of a LPS-regulatory gene having an LPS binding domain in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*[J]. Mol Immunol, 2006, 43: 2061–2069.
- [39] Vega E, Leary N, Shockey J, et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection[J]. Mol Immunol, 2008, 45: 1916–1925.
- [40] Mai W, Hu C. cDNA cloning, expression and antibacterial activity of lysozyme C in the blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*)[J]. Prog Nat Sci, 2009, 19: 837–844.

## Construction of a cDNA library from the haemocytes of *Exopalaemon carinicauda* and analysis of partial expressed sequence tags

DUAN Yafei<sup>1,2</sup>, LIU Ping<sup>2</sup>, LI Jitao<sup>2</sup>, LI Jian<sup>2</sup>, CHEN Ping<sup>2</sup>

1. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, PR China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, PR China

**Abstract:** A haemocyte cDNA library of *Exopalaemon carinicauda* was constructed by SMART<sup>TM</sup> technology. We determined that the titer of the primary cDNA library was  $2.8 \times 10^6$  pfu/mL, the recombinant efficiencies were over 99%, the insert size of the library was between 400 bp and 2 000 bp, and the titer of the amplified cDNA library was  $4.3 \times 10^9$  pfu/mL. One hundred single clones were selected randomly to screen for primary detection and a total of 95 high quality ESTs, averaging 493 bp, were obtained. The ESTs were assembled into 70 unigenes, comprising 11 contigs and 59 singlets. When compared with the public database by Blast, 20 unigenes were highly homologous ( $E$ -value  $< 1e-5$ ) to known genes, two unigenes were unknown genes (hypothetical protein), and 48 unigenes had no significant homology to any sequence. Several functional genes of *E. carinicauda*, including Troponin I, Enolase, Anti-lipopolysaccharide factor and Lysozyme, were identified by homology comparison. The quality of this haemocyte cDNA library is of a high enough standard to obtain haemocyte-specific expression gene information. These results provide important information on functional genes and lay the groundwork for screening of molecular markers in *E. carinicauda*.

**Key words:** *Exopalaemon carinicauda*; haemocytes; cDNA library; EST; sequence analysis

**Corresponding author:** LIU Ping. E-mail: liuping@ysfri.ac.cn