

仿刺参 cDNA 文库构建以及序列分析

徐赛涛, 丛丽娜, 朱蓓薇

(大连工业大学 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034)

摘要:应用 Gubler-Hoffman cDNA Library Construction 技术, 构建仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) cDNA 文库。测试结果表明, 库容量为 2.0×10^6 pfu/mL, 利用 PCR 方法检测 cDNA 文库插入 DNA 片段的大小, 其长度范围在 0.5~4.1 kb, 插入片段平均长度为 1.3 kb, 表明该文库达到建库要求, 可用于筛选低丰度 mRNA 的基因克隆。随机挑选 100 个 1 kb 以上的 cDNA 克隆进行测序分析, 发现有 25 条 EST 序列和网上公布的其他物种的序列相似性较高, 这些基因与刺参能量代谢和蛋白水解相关。其中发现的几个重要基因, 如编码遍在蛋白以及缢蛏蛋白等的基因, 可能与仿刺参自溶过程的蛋白酶水解和细胞凋亡事件相关, 进一步的研究还在进行。另有 49 条 EST 序列相似性较低, 推测可能是功能未知的新基因。仿刺参 cDNA 文库的成功构建, 为下一步大量 EST 序列分析和功能性新基因的发现, 以及从基因水平认识仿刺参这一特殊棘皮动物的生长、发育和代谢规律奠定了基础。[中国水产科学, 2007, 14 (7): 7-11]

关键词:仿刺参; cDNA 文库; 蛋白水解

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)07-007-05

仿刺参 [*Apostichopus japonicus* (Selenka)], 属棘皮动物门 (Echinodermata), 海参纲 (Holothuroidea), 楯手目 (Aspidochirota), 刺参科 (Stichopodidae), 仿刺参属 (*Apostichopus*)。仿刺参含有丰富的蛋白质、黏多糖和多种微量元素, 具有很高的营养和药用价值, 一向被视为名贵的滋补食品和佐膳佳肴。国内外研究表明, 仿刺参含有许多具有重要生物学活性的物质, 如多糖、皂苷、脂肪酸、多肽、仿刺参毒素、仿刺参神经节苷酯等^[1], 具有增加免疫力^[2]、抗癌^[3]、抗凝血^[4]、抗肿瘤^[5]等作用。然而目前对于仿刺参的分子遗传及其基因信息的研究报道相对较少。本研究构建了仿刺参 cDNA 文库, 并对部分阳性克隆的 cDNA 插入片段进行测序和序列分析, 为从基因水平研究仿刺参提供重要的序列信息, 为进一步研究仿刺参的生长、发育和代谢规律奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

所用仿刺参 (*Stichopus japonicus*) 捕获于大连獐子岛附近海域。

1.2 试剂

Gubler-Hoffman cDNA Library Construction Kit、RNAiso Reagent 试剂盒以及 Oligotex-dT30

(Super) mRNA Purification Kit 和 pAP3neo Predigested Vector 均购自 TaKaRa Biotechnology (Dalian) Co. Ltd, DNA Ladder 购自 TIANGEN 公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 和 mRNA 的分离提取 取仿刺参外壁组织 2 g, 迅速转移至用液氮预冷的研钵中, 用研杵研磨, 其间不断加入液氮, 直至研磨成粉末状。用 TaKaRa 公司提供的 RNAiso Reagent 试剂盒提取总 RNA, 再经琼脂糖电泳检测和 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析总 RNA 质量。分离 mRNA 使用 TaKaRa 公司的 Oligotex-dT30 (Super) mRNA Purification Kit 分离系统, 再由琼脂糖电泳检测和 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析 mRNA 质量。

1.3.2 cDNA 双链的合成 参照 TaKaRa 公司的 cDNA Library Construction Kit, 利用反转录酶 M-MLV, Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer 和 5'-methyl dCTP 合成第一链 cDNA, 并含有 Not I 酶切位点。然后用 *E. coli* RNase H 使 mRNA-1st Strand cDNA 杂合体中的 RNA 形成缺口, 再使用 *E. coli* DNA Polymerase 和 *E. coli* DNA Ligase 将 RNA 链置换成 DNA 链, 合成第二链 cDNA。

1.3.3 cDNA 文库构建及鉴定 使用 T4 DNA

收稿日期: 2007-05-25; 修订日期: 2007-07-13.

基金项目: 国家自然科学基金 (30571449); 973 计划前期研究 (2006CB708210).

作者简介: 徐赛涛 (1981-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋动物功能基因的研究. E-mail: yuyixst@163.com

通讯作者: 丛丽娜; 朱蓓薇. Tel: 0411-86323262; 0411-86324521; Fax: 0411-86323646; E-mail: conglina@dlpu.edu.cn; zhubeiwei@163.com

Polymerase 将双链 cDNA 末端平滑化,与带有 *EcoR* I 酶切位点的 *Adapto* 连接,再使用 *Not* I 进行酶切,经 *Spin Column* 除去短链 cDNA (<400 bp),最后带有 *EcoR* I-*Not* I 酶切位点的 cDNA 片断与 *EcoR* I-*Not* I 酶切载体 pAP3neo 进行连接。电转化至 *E. coli* DH10B 感受态细胞中,用预冷的 SOC 溶液回收后,转移至培养管中,37℃振荡培养 1 h。取部分培养液涂布于每毫升 LB 培养基含 100 μg 氨苄青霉素 (LB/Amp) 的琼脂平板上,再取 1 μL、10 μL 和 100 μL 转化液按 10^{-3} 、 10^{-2} 、 10^{-1} 稀释后,涂布于 LB/Amp 琼脂平板,37℃过夜培养,统计菌落数。在确认转化效率后,剩余的转化产物涂布于直径 15 cm LB/Amp 平板培养基上,控制每个平板约产生 5 万个以下的克隆,37℃过夜培养;向平板中生成的菌落加入 2 ml LB/Amp 液体培养基,洗脱菌落并进行回收,得到的菌液制作成 20% 的甘油溶液后,-80℃保存。从文库中随机挑取 15 个菌落进行 PCR 扩增,用 T₇ Promoter Primer (T₇) 和 T₃ Promoter Primer (T₃) 进行 PCR 反应,PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 cDNA 片段的大小。

1.3.4 重组质粒的筛选与鉴定 以 T₇ 和 T₃ 为引物,用无菌牙签轻轻蘸取白色单菌株加到 20 μL 灭菌水离心管中混合几下,然后 99℃ 10 min 热变性,室温高速离心 12 000 r/min,3 min。取上清 2 μL 作模板,按以下反应条件:95℃,1 min;94℃,30 s;55℃,30 s;72℃,3 min;30 个循环;72℃ 延伸 10 min 进行 PCR 扩增快速筛选重组子。在 1.0% 琼脂糖凝胶电泳条件下,对 PCR 产物进行鉴定及分析。

1.3.5 重组质粒测序 选择合适的阳性重组质粒。以 T₇ 和 T₃ 为测序引物,由 TaKaRa Biotechnology (Dalian) 公司测序。

1.3.6 序列分析 所测序列经过 VecScreen 程序去除载体序列后,分别用 BLASTn 和 BLASTx 在 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 的核苷酸和蛋白质数据库中搜索,进行序列的相似性分析^[6]。E 值大于 10^{-5} ,则认为序列的相似性很低,即“low hits”。因为克隆序列数量不多,没有对其进行归类等处理,而是逐一进行分析。

2 结果与分析

2.1 仿刺参总 RNA 提取

使用 RNAiso Reagent 试剂盒提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳,可见清晰的 28S 和 18S 两条 rRNA 条

带(图 1A)。再由 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析总 RNA 质量(图 1B),从峰型中可以看到 5S、18S、28S 3 条峰清晰明显,而且 28S、18S 的比值接近 2:1。说明 RNA 没有降解,提取的 RNA 质量较高。

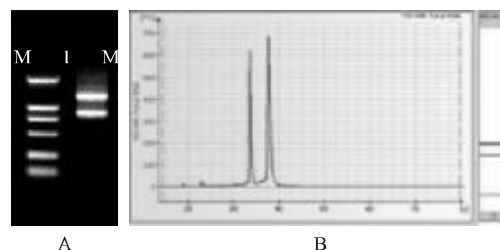


图1 仿刺参总 RNA 提取结果

A: 1.0% 琼脂糖电泳图 (M: DNA Marker DL2000); B: 总 RNA 质量的 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析图。

Fig.1 Analysis of total RNA of *S. japonicus*

A: 1.0% agarose gel electrophoresis (M: DNA Marker DL2000);

B: Agilent 2100 Bioanalyzer analysis of total RNA quality.

2.2 mRNA 的提取

使用 Oligotex - dT30 (Super) mRNA Purification Kit 提取 mRNA,在琼脂糖凝胶电泳上可见条带分散(图 2A)。利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析 mRNA 质量(图 2B),呈现良好的连续峰,无碎峰,说明 mRNA 的提取质量较好。

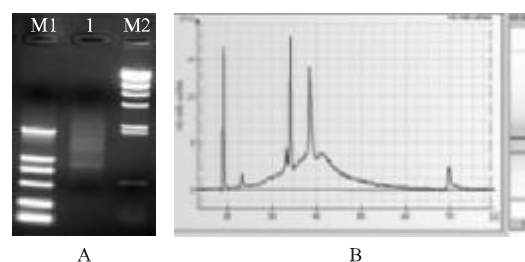


图2 仿刺参 mRNA 提取结果

A: 1.0% 琼脂糖电泳图 (M1: DNA Marker DL2000; M2: λ - Hind III digest); B: mRNA 质量的 Agilent 2100 Bioanalyzer 分析图。

Fig.2 Analysis of mRNA of *S. japonicus*

A: 1.0% agarose gel electrophoresis of mRNA (M1: DNA Marker DL2000; M2: λ - Hind III digest); B: Agilent 2100 Bioanalyzer analysis of mRNA quality.

2.3 cDNA 文库质量检测

经测算,该仿刺参 cDNA 文库的滴度为 2.0×10^6 pfu/mL,达到了试剂盒中文库的滴度应在 10^6 pfu/mL 以上这一要求。任意挑选了 30 个菌落进行 PCR 反应检测插入片段长度。部分电泳结果

如图 3 所示。结果显示,其中全部含有插入片段,而插入片段的长度范围在 0.5~4.1 kb, 平均插入片段长度 1.3 kb。以上结果说明,所构建的仿刺参的 cDNA 文库在库容量和插入片段大小等方面均符合良好文库的质量标准,能够满足测序的要求。



图 3 菌落 PCR 验证文库插入片段结果

Fig.3 PCR identification of the constructed library

M1: DNA Marker DL2000; M2: λ -Hind III digest; Lanes 1 - 15: cDNA insert fragments were amplified

2.4 仿刺参 cDNA 的序列测定和分析

随机挑选了 100 个 1 kb 以上的 cDNA 克隆, 进行序列测定。测序结果先经 NCBI 上的 VecScreen 程序去除载体序列后, 经 BLASTn 和 BLASTx 分析, 其中有 25 条 EST 序列和网上公布其他物种的序列相似性较高(表 1), 这些基因与仿刺参能量代谢和蛋白水解相关。经过分析 25 条 EST 全部为正义链, 包含 1 个全长序列 pHS2, 长度为 1 047 bp, 最短的是 pHS45, 为 605 bp, 平均长度为 783 bp; 这些可能是仿刺参中存在的已知基因, 另有 75 条 EST 序列经 BLAST 比较其分值都很低, 可能是一些未知序列。所得的 EST 序列尚未提交到 GenBank。

表 1 仿刺参 cDNA 克隆与 NCBI 同源序列分析结果

Tab.1 BLASTX analysis of cDNA clones from the cDNA library of *S. japonicus*

克隆 Clone	推测的同源蛋白 Putative Identification	物种/阳性数量/登记号 Species /Positives /Accession no	长度 /bp Length	E
pHS7	Ribosomal protein S4 (核糖体蛋白)	<i>Gallus gallus</i> /225 /251 (89 %) /gi: 46048780	798	3e ⁻¹¹⁶
pHS32	Ribosomal protein L23a (核糖体蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /146 /180 (81 %) /gi: 115750203	824	1e ⁻⁵⁴
pHS58	Ribosomal protein L30 (核糖体蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /107 /111 (96 %) /gi: 72005286	761	1e ⁻⁵¹
pHS4	Alpha-5 collagen (IV 型胶原蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /124 /181 (68 %) /gi: 115694617	797	7e ⁻⁵⁰
pHS65	Fibrillar collagen (纤维胶原蛋白)	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> /84 /124 (67 %) /gi: 13325096	700	3e ⁻²⁵
pHS68	Alpha-5 collagen (IV 型胶原蛋白)	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i> /101 /218 (46 %) /gi: 38490686	750	2e ⁻¹¹
pHS63	NADH dehydrogenase subunit 1 (NADH 脱氢酶)	<i>Cucumaria miniata</i> /228 /269 (84 %) /gi: 49146287	810	5e ⁻⁷⁴
pHS9	Similar to melanotransferrin (类黑素转铁蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /91 /132 (68 %) /gi: 115744213	799	3e ⁻⁴⁹
pHS26	Ferritin (铁蛋白)	<i>Apostichopus japonicus</i> /172 /173 (99 %) /gi: 68303301	741	8e ⁻⁹⁵
pHS6	Polyubiquitin (多聚泛蛋白)	<i>Polyplastron multivesiculatum</i> /120 /146 (82 %) /gi: 92790172	795	1e ⁻⁴⁹
pHS57	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (泛素 C-末端水解酶)	<i>Bos taurus</i> /153 /177 (86 %) /gi: 76253713	735	1e ⁻⁶⁸
pHS39	Cytochrome c oxidase subunit III (细胞色素氧化酶)	<i>Cucumaria miniata</i> /213 /241 (88 %) /gi: 49146280	735	8e ⁻⁹³
pHS60	Cytochrome oxidase 1 (细胞色素氧化酶)	<i>Parastichopus californicus</i> /242 /263 (92 %) /gi: 1046317	791	1e ⁻¹⁰³
pHS19	Egg binding receptor 1 precursor (卵结合蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /84 /147 (57 %) /gi: 115955286	753	1e ⁻¹⁶
pHS15	Embryonic (胚胎蛋白)	<i>Hydra vulgaris</i> /106 /217 (48 %) /gi: 58372550	795	4e ⁻¹⁹
pHS45	ATP synthase F0 subunit 6 (ATP 合成酶)	<i>Cucumaria miniata</i> /127 /160 (79 %) /gi: 49146279	605	2e ⁻⁵³
pHS53	Alpha-amylase (α -淀粉酶)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /135 /206 (65 %) /gi: 72009994	791	2e ⁻⁵⁰
pHS54	Y-Box factor (Y-Box 因子)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /86 /111 (77 %) /gi: 72008824	792	1e ⁻³⁴
pHS72	V-fos transformation effector (转化效应子)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /194 /211 (91 %) /gi: 72086123	797	4e ⁻¹⁰⁰
pHS35	Hypothetical protein (推测蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /115 /216 (53 %) /gi: 115609616	728	2e ⁻³⁷
pHS52	Hypothetical protein (推测蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /171 /230 (74 %) /gi: 115920236	796	7e ⁻⁶⁸
pHS3	MGC69403 protein (SWI/SNF 蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /162 /180 (90 %) /gi: 115934488	797	2e ⁻⁸²
pHS31	Nhp2 (HMG 类似核蛋白)	<i>Apis mellifera</i> /111 /121 (91 %) /gi: 66558122	861	8e ⁻⁴²
pHS11	MGC80496 protein (SWI/SNF 蛋白)	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> /76 /104 (73 %) /gi: 115718850	796	1e ⁻²²
pHS2	Stromal cell derived factor 2-like protein (基质细胞衍生因子)	<i>Branchiostoma belcheri tsingtaunense</i> /103 /191 (53 %) /gi: 47524509	1047	2e ⁻²⁵

3 讨论

构建高质量的 cDNA 文库是筛选功能基因的前提和保证。首先,文库要有足够的代表性,即要有一定的库容量,而本文库的库容量为 2.0×10^6 pfu/mL,已达到高质量的文库要求;其次,插入片段长度是评价文库质量的另一个标准。在制作文库时,首先进行了 cDNA 片段的长度筛选,基本上去除了 400 bp 以下的 cDNA 短片段,提高了全长 cDNA 插入效率。用 PCR 法随机检测插入片段的长度范围为 0.5~4.1 kb,平均插入片段长度 1.3 kb。综上所述,仿刺参 cDNA 文库的构建是成功的,可用来筛选低丰度 mRNA 的基因,为接下来的大规模筛选奠定了基础。

通过对仿刺参部分 EST 序列的比对分析,本实验发现了一些有一定研究意义的基因。如编码 V-fos 转化效应因子蛋白、Y-Box 因子、编码胶原蛋白、NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、ATP 合成酶、以及核糖体不同亚基的基因片段,还有一些功能尚未确定其功能的核酸序列等,这些基因片段在仿刺参中还未见报道,有望成为新的有应用价值的功能基因。

仿刺参在不利的环境条件下的自溶机理至今未阐明,在文库中还发现了和仿刺参自溶相关的基因。如编码遍在蛋白有关的基因,多聚遍在蛋白 (polyubiquitin) 和泛素 C-末端水解酶 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)。泛素蛋白水解酶复合体途径是真核细胞内多条蛋白质降解途径之一,该途径是真核细胞中高效和高度选择性的特异性降解蛋白质的重要途径,广泛参与机体多种代谢活动,包括细胞凋亡、MHC I 类抗原的递呈、细胞周期以及细胞内信号转导,与细胞的一些生理功能和病理状态有着密切的联系^[7]。Polyubiquitin 基因表达和加工后的遍在蛋白单体主要用于遍在蛋白介导的蛋白水解途径^[8]。而泛素 C-末端水解酶能特异性识别泛素 C 末端区域,促进泛素再循环,对泛素系统的正常运行起重要作用^[9]。还有编码黑素转铁蛋白 (Melanotransferrin) 的基因片段。黑素转铁蛋白,又称 p97 或缬酪肽蛋白 (Valosin-containing protein, VCP)。已有研究证明^[10-14],VCP 的所有活性直接或间接地由泛素依赖的蛋白降解途径通过泛素蛋白酶体 (Ubiquitin proteasome, Ub-pr) 调控,在此途径中 VCP 是作为一个普遍存在的分子伴侣来标记多种

底物,到蛋白酶处降解。研究证实^[15],VCP 的抗凋亡作用及促肿瘤转移作用是通过激活核转录因子 NF- κ B (Nuclear-Factor kappa B, NF- κ B) 信号转导通路实现的。VCP 既是蛋白降解途径 Ub-pr 分子伴侣,又是细胞凋亡的重要因子。仿刺参中遍在蛋白和 VCP 的发现对于研究仿刺参自溶现象具有一定的意义。而这些基因所编码的蛋白是否参与仿刺参自溶过程的蛋白酶水解和细胞凋亡过程,还有待于进一步研究。

近年来,对仿刺参的研究主要集中在养殖和药物功能上,而有关其基因水平的报道较少,且多数集中在仿刺参微卫星 DNA 上^[16-18]。本研究在成功构建 cDNA 文库的基础上,对部分 EST 序列的初步筛选分析发现既有与仿刺参的物质转换和能量代谢相关的重要功能基因,又有和蛋白水解相关的重要基因,表明本文库可作为筛选仿刺参自溶相关基因的重要资源。

参考文献:

- [1] 宋迪,吉爱国,梁浩,等.刺参生物活性物质的研究进展[J].中国生化药物杂志,2006,27(5):316-319.
- [2] Imanari T, Washio Y, Huary Y, et al. Oral absorption and clearance of partially depolymerized fucosyl chondroitin sulfate from sea cucumber [J]. Thromb Res, 1999, 93 (3): 129-135.
- [3] Moon J H, Ryu H S, Yang H S, et al. Antimutagenic and anticancer effect of glycoprotein and chondroitin sulfates from sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Korean Soc Food Nutr, 1998, 27 (2): 350-358.
- [4] Nagase H, Enryoji K, Kato H. Effect of depolymerized holothurian glycosaminoglycan (DHG) on tissue factor pathway inhibitor in vitro and in vivo studies [J]. Thromb Haemost, 1997, 78 (2): 864-870.
- [5] 王静凤,王奕,赵林,等.日本刺参的抗肿瘤及免疫调节作用研究[J].中国海洋大学学报,2007,37(1):93-96.
- [6] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25 (17): 3389-3402.
- [7] Pickart C M, Eddins M J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms [J]. Biochem Biophys Acta, 2004, 1695 (1-3): 55-72.
- [8] Von Kampen J, Wettern M, Schulz M. The ubiquitin system in plants [J]. Physiol Plant, 1996, 97: 618-624.
- [9] Chung C H, Baek S H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266: 633-640.
- [10] Dai R M, Li C C. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation [J]. Nature Cell Biol, 2001, 3: 740-744.

- [11] Rabinovich E, Kerem A, Frohlich K U, et al. AAA-ATPase p97 / Cdc48p, a cytosolic chaperone required for endoplasmic reticulum-associated protein degradation [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22: 626 – 634.
- [12] Uchiyama K, Jokitalo E, Kano F, et al. VCP135, a novel essential factor for p97 / p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo [J]. J Cell Biol, 2002, 159: 855 – 866.
- [13] Meyer H H, Wang Y, Warren G. Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4 [J]. EMBO J, 2002, 21: 5 645 – 5 652.
- [14] Chen Z J. Ubiquitin Signaling in the NF- κ B Pathway [J]. Nat Cell Biol, 2005, 7 (8): 758 – 765.
- [15] Asai T, Tomita Y, Nakatsuka S, et al. VCP (p97) regulates NF kappa B signaling pathway, which is important for metastasis of osteosarcoma cell line [J]. Jpn J Cancer Res, 2002, 93: 296 – 304.
- [16] Kanno M, Li Q, Kijima A. Isolation and characterization of twenty microsatellite loci in Japanese sea cucumber (*Stichopus japonicus*) [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7 (3): 179 – 183.
- [17] 李颖, 刘萍, 孙慧玲, 等. 仿刺参 (*Apostichopus japonicus*) mtDNA 三个基因片段的序列分析 [J]. 海洋和湖沼, 2006, 37 (2): 143 – 153.
- [18] 杨磊, 卢月娇, 单雪, 等. 海参微卫星 DNA 的筛选与克隆的初步分析 [J]. 生物技术通讯, 2006 (增刊): 427 – 429.

Construction and analysis of cDNA library from the sea cucumber *Stichopus japonicus*

XU Sai-tao, CONG Li-na, ZHU Bei-wei

(School of Biology and Food Technology, Dalian Polytechnic University, Dalian, 116034 China)

Abstract: The sea cucumber *Stichopus japonicus* is one of the important cultured aquatic species with strong autolysis capability. The present study constructed the library of *Stichopus japonicus* and analyzed the cDNA of the library. Total RNA was extracted from the grounded frozen powder of the *S. japonicus* body wall by using acid-guanidine-phenol-chloroform (AGPC). Poly (A)⁺ RNA was isolated and purified by Oligo (dT) Cellulose. The mRNA template was reversely transcribed to a single strand cDNA with Oligo (dT)₁₈ Anchor Primer containing Not I site according to Takara cDNA Library Construction Kit. Both ends of the newly generated and polished double-stranded (ds) cDNA were attached by the EcoR I adaptors and the ds cDNA was then restricted by Not I. The short cDNA (<400 bp) was removed by Spin Column. The synthesized ds cDNA was finally ligated to the vector of pAP3neo predigested by EcoR I-Not I. The titer of the constructed library is 2.0×10^6 pfu/mL. The PCR results by randomly isolated 15 clones showed that all of them contain recombinant DNA fragments and the average size of inserts was 1.3 kb. Clones containing cDNA longer than 800 bp were selected for sequencing using T7 and T3 promoter primers. A lot of expressed sequence tags (ESTs) were obtained by sequencing from the 5' end of the cDNA clones and then the ESTs were compared with sequences in the GenBank and EST databases of NCBI using Blast search. Among 100 ESTs obtained, 25 showed sequence homology to previously identified genes, and 75 matched uncharacterized genes. The most interesting findings were the genes involved in proteolysis and cell apoptosis which may be specific to the autolysis of sea cucumbers, including polyubiquitin and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, ferritin and melanotransferrin. Other characteristic features such as genes encoding ribosomal protein subunits, collagen, cytochrome c oxidase, NADH dehydrogenase, α -amylase and so on were also observed which are essential to cellular and energy metabolism. The successful construction of cDNA library from *Stichopus japonicus* and further analysis of ESTs will gain insight into molecular manifestation of development and metabolism in sea cucumbers and accelerate functional and regulation gene discovery. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (7): 7 – 11]

Key word: *Stichopus japonicus*; cDNA library; proteolysis

Corresponding author: CHONG Li-na; ZHU Bei-wei.