

虾夷扇贝外套膜和肾脏组织 cDNA 文库构建以及 EST 的初步分析

李云峰¹, 刘卫东¹, 高祥刚¹, 李文姬¹, 刘莹^{1,2}, 傅立元^{1,2}, 李宏俊¹, 王健^{1,2},
鲍相渤¹, 赫崇波¹

(1. 辽宁省海洋水产科学研究院, 辽宁省海洋水产分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 辽宁师范大学 生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要: 利用 SMART cDNA 文库构建试剂盒首次构建了健康虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 外套膜和肾脏 2 种组织的 cDNA 文库。2 个文库容量分别为 2.30×10^6 CFU/mL 和 1.20×10^6 CFU/mL, 重组率均超过 98%, 平均插入片段长度均大于 1 kb, 文库质量符合标准要求。将随机选取的 4 009 个克隆进行 5' 端测序, 得到 3 884 个有效序列 (外套膜 923 个, 肾脏 2 961 个), 测序成功率 96.9%。经过质量控制和拼接, 共得到 2 007 条单基因簇 (Unigenes), 包含 363 个序列重叠群 (Contigs) 和 1 644 条单一序列 (Singletons)。通过 BLASTx 和 BLASTn 搜索比对, 共有 659 个 Unigenes (外套膜 157 个; 肾脏 502 个) 获得了基因注释 ($E < e^{-5}$), 占 Unigene 总数的 32.84%。对 Unigene 的功能和分类进行了初步分析, 发现多种与免疫相关的基因, 如凝集素、超氧化物歧化酶、溶菌酶、大防卫素等。利用 SSRIT 在线工具对 2 007 条 Unigene 查找微卫星, 发现有 69 个 EST 中含有微卫星序列, 其中 40 个可以用于引物设计。虾夷扇贝 cDNA 文库的成功构建, 为进一步的 EST 分析、功能基因的表达和克隆、多态性 EST-SSR 的筛选以及虾夷扇贝分子遗传学研究、种质资源评价和分子选育等奠定了基础。[中国水产科学, 2010, 17(3): 578-585]

关键词: 虾夷扇贝; cDNA 文库; 免疫相关基因; EST-SSR

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)03-0578-08

虾夷扇贝 (*Mizuhopecten yessoensis*) 原产于日本北部及俄罗斯远东地区沿海水域, 具有生长快、肉味鲜美、经济价值高等特点, 已成为中国北方主要的经济养殖贝类之一。近几年, 养殖过程中病害频发, 出现大规模死亡现象, 严重制约着该产业的发展, 病害问题成为制约中国虾夷扇贝产业可持续发展的主要瓶颈之一。为了增强虾夷扇贝群体的抗病性, 一方面可以进行抗病品种或品系的选育^[1-2]; 另一方面可以通过选择合适的免疫增强剂来提高贝类机体的防御功能^[3-4]。目前, 对虾夷扇贝抗病基因的克隆和表达是研究其群体抗病性的基础和关键。

近几年, 国内外学者通过构建 EST 文库方式对

扇贝免疫相关基因进行筛选和克隆, 并研究扇贝的免疫反应特征和抗病机制^[5-8]。本研究首次建立了虾夷扇贝 2 种组织全长 cDNA 的文库, 对其进行 EST 分析, 不仅可以获得虾夷扇贝相关的遗传信息, 也为进一步克隆与虾夷扇贝生长、分化、免疫等相关基因奠定基础, 同时还可以通过构建文库筛选用于构建遗传连锁图谱的遗传标记, 如 SSRs 和 SNPs, 而这些标记在相近物种间相对保守, 在比较基因组研究中具有重要价值。通过对这些基因和标记的研究, 能更深入地探讨虾夷扇贝生理生化的特性及生长和抗病性状有的遗传机制, 并用于优良性状的选择。

收稿日期: 2009-08-15; **修订日期:** 2009-11-12.

基金项目: 国家海洋公益性行业科技专项项目 (200805037); 辽宁省科学技术计划重大、重点项目 (2008203001); 辽宁省海洋与渔业科研计划项目 (200801)。

作者简介: 李云峰 (1979-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为水产分子遗传学. E-mail: yunfengli@126.com

通讯作者: 赫崇波 (1961-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为水产分子遗传学. Tel: 0411-84697003; E-mail: hechongbo@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用样品为2龄健康虾夷扇贝,于2008年8月采自大连市旅顺口龙王塘养殖场,随机选取15个个体,分别取其外套膜和肾脏组织,各组织分别混合后放入液氮中保存。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取 将2种不同的组织分别置于加入适量RNAiso Reagent (TaKaRa)的研钵中,在液氮中充分研磨,按照说明书的步骤提取总RNA。将所提取的总RNA进行电泳,检测总RNA的完整性。用Oligotex™-dT30 (Super) mRNA纯化试剂盒 (Takara),进行mRNA的分离纯化。

1.2.2 虾夷扇贝2种组织cDNA文库的构建及检测 根据Creator™ SMART™ cDNA文库构建试剂盒 (Clontech) 说明书,以纯化后的2种组织的RNApoly (A)⁺mRNA为模板,以带有Sfi I酶切位点的SMART IVTM Oligonucleotide和CDSIII/3' PCR Primer为引物,在反转录酶作用下转录合成cDNA第1链。确定最佳循环数后在Advan-tage 2 PCR Kit (Clontech) 作用下合成cDNA第2链。双链cDNA经Sfi I酶切及片段纯化后,连接到pDNR-LIB载体上。将含有cDNA的质粒载体转化到感受态细胞DH10B中。检测文库质量合格后,向转化细胞中加入50%的甘油,混匀后放入-80℃冰箱保存。

库容量测定: 取1 mL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。库容量=菌落数×稀释倍数×转化细胞总数/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50个克隆至1 mL LB液体培养基中,37℃培养过夜后,用M13引物进行PCR,扩增后凝胶电泳检测PCR结果。

重组率计算: 对随机挑取的50个单克隆进行

PCR扩增后,计算重组克隆和非重组克隆的比值,确定重组率。

1.2.3 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^[9]。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。

1.2.4 微卫星重复序列查找 利用在线工具SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool, <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>) 查找2个文库中的微卫星重复序列,最小重复参数设为二碱基重复7次,三碱基5次,四碱基4次,五碱基4次,六碱基3次。微卫星序列去掉载体序列后,采用软件Primer Premier5.0进行引物设计。

2 结果与分析

2.1 虾夷扇贝外套膜和肾脏组织总RNA的提取及cDNA的合成

高质量的RNA是构建高质量cDNA文库的首要条件。凝胶电泳结果显示所提RNA完整性好,没有发生降解。

合成的双链cDNA经1%琼脂糖凝胶电泳检测显示,双链cDNA从大到小均匀分布,大小在0.5~4.0 kb之间且主要集中于500 bp以上,表明应用2种不同方法构建的文库所合成的cDNA条带均清晰,分子量较分散,证明cDNA已成功反转录。

2.2 cDNA文库质量

取1 μL细胞转化液稀释一定倍数后,各取10 μL稀释过的菌液涂布,37℃培养过夜后,计算克隆总数,测得外套膜和肾脏2种组织的cDNA文库的原始库容量分别为 2.30×10^6 CFU/mL和 1.20×10^6 CFU/mL。随机选取单克隆菌落以M13引物进行扩增,根据PCR扩增结果计算得到重组率超过98%,且插入片段大部分都大于500 bp,平均长度大于1 000 bp。

2.3 EST测序及初步分析

2.3.1 EST测序、拼接和注释 对随机选取的4 009个克隆进行5'端测序,得到3 884条有效序列(外套膜923,肾脏2 961),去除低质量序列和小于100 bp的序列后,经过软件拼接,共得到2 007个单基因簇,包含363个序列重叠群和1 644条单一序列。通过BLASTx和BLASTn搜索比对,共有659个单基因簇(外套膜157;肾脏502)获得了基因注释,占总数32.8%,没有获得比对的有1 348条(67.2%)。

2.3.2 已知EST基因分类及部分基因功能分析 通过Gene Ontology^[10]法分类,659个单基因簇

获得了基因注释,其中26条单基因簇为未知功能基因。对余下的633条单基因簇按功能分类,发现一般功能预测基因(General function prediction only)数量最多,有95条(外套膜15,肾脏80);翻译、核糖体结构和生物发育方面基因(Translation, ribosomal structure and biogenesis)和信号转导机制(Signal transduction mechanisms)基因次之,分别有84条(外套膜54,肾脏30)和73条(外套膜7,肾脏66);防御(Defense mechanisms)和RNA加工修饰(RNA processing and modification)基因数量最少,分别只有2条(表1)。

表1 GO法分类预测的单基因簇功能和数量
Tab. 1 Summary statistics of functions and numbers of unigenes by GO (Gene Ontology) analysis

推定功能 Putative function	外套膜 Mantle	肾脏 Kidney
氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	1	55
糖类转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	3	27
细胞分裂与染色体分离 Cell division and chromosome partitioning	7	4
细胞膜包膜合成,外膜 Cell envelope biogenesis, outer membrane	1	8
染色质结构和动力学 Chromatin structure and dynamics	1	6
辅酶代谢 Coenzyme metabolism	2	5
细胞骨架 Cytoskeleton	12	17
DNA复制、重组与修复 DNA replication, recombination, and repair	2	5
能量产生与转化 Energy production and conversion	15	39
功能未知 Function unknown	5	21
仅有预测功能 General function prediction only	15	80
无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	5	21
细胞内转运和内分泌 Intracellular trafficking and secretion	4	4
脂代谢 Lipid metabolism	1	16
核苷酸转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	1	5
转录后修饰、蛋白质折叠、伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	18	43
次级代谢产物生物合成、转运及分解 Secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism	1	35
信号转导 Signal transduction mechanisms	7	66
转录 Transcription	2	11
翻译、核糖体结构和生物发育 Translation, ribosomal structure and biogenesis	54	30
防御机制 Defense mechanisms	0	2
RNA加工修饰 RNA processing and modification	0	2

比较虾夷扇贝外套膜和肾脏cDNA文库发现2种组织所含功能基因也有一定差异,可能由于肾脏是承担抗氧化和清除H₂O₂、参与免疫防御的重要器官^[11],因而在维持机体内环境稳定方面发挥着重要

的功能。其中,与防御机制(Defense mechanisms)及加工和修饰RNA (Processing and modification RNA)有关的基因仅发现于肾脏中,而外套膜中参与控制翻译、核糖体结构和生物发生(Translation, ribosomal

structure and biogenesis) 的基因数量较多。所得到的单基因簇已经提交到 GenBank ESTs 库中, 登录号为 GR867007–GR868079 和 GH734852–GH735787。

在利用 BLASTx 分析得到的 2 007 条单基因簇中, 与现有数据库中的序列具有明显相似性 ($E < e^{-5}$) 的序列有 1 048 条, 占总数的 52.2%。659 条得到基因注

释的的序列中, 有 55 条序列与已知扇贝类 (*Argopecten irradians*、*Chlamys farreri*、*Mizuhopecten yessoensis*) EST 相似, 65 条序列与海胆 (*Strongylocentrotus purpuratus*) 的 EST 相似, 序列相似性比较中发现多种与机体免疫防御相关的基因, 如凝集素、超氧化物歧化酶、溶菌酶、丝氨酸蛋白酶抑制剂、大防卫素等, 比对结果见表 2。

表 2 部分免疫相关基因比对结果
Tab. 2 BLASTx analysis of some immune-relevant genes

登录号 Accession No.	推测的同源基因 Putative homologous gene	同源物种 Homologous species	长度 /bp Size	期望值 E-value
GR867054	金属硫蛋白 Metallothionein	<i>Argopecten irradians</i>	801	1e-24
GR867761	凝溶胶蛋白 Gelsolin	<i>Suberites ficus</i>	794	1e-102
GR867772	钙调节蛋白 Calponin-like protein	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	876	3e-53
GR867754	铁蛋白 Ferritin	<i>Chlamys farreri</i>	812	3e-78
GR867767	锌金属蛋白 Zinc metalloproteinase, STE24 homolog	<i>Mus musculus</i>	542	1e-36
GR867723	热休克蛋白 70 Heat shock protein 70	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	844	1e-141
GR867757	硫氧还原蛋白 Thioredoxin	<i>Chlamys farreri</i>	847	7e-29
GR867296	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase	<i>Chlamys farreri</i>	792	2e-65
GR867143	锰超氧化物歧化酶 Manganese-superoxide dismutase	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	851	9e-90
GR867286	细胞色素 C 氧化酶 Cytochrome c oxidase subunit I	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	974	2e-142
GR867752	溶菌酶 Goose-type lysozyme	<i>Chlamys farreri</i>	731	6e-83
GR867155	谷胱甘肽 S- 转移酶 Glutathione S-transferase	<i>Crassostrea gigas</i>	734	6e-55
GH734888	胰脂肪酶 Pancreatic lipase	<i>Tribolium castaneum</i>	759	2e-50
GR867764	谷胱甘肽过氧化物酶 Glutathione peroxidase I	<i>Danio rerio</i>	691	3e-44
GH735048	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	<i>Pinctada fucata</i>	825	1e-73
GH735843	NADH 脱氢酶 NADH dehydrogenase subunit 1	<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	852	4e-98
GR867691	C 型血细胞凝集素 B C-type lectin B	<i>Chlamys farreri</i>	416	2e-37
GH736001	大防卫素 Big defensin	<i>Argopecten irradians</i>	898	2e-30
GH735082	泛素 Ubiquitin C variant 2	<i>Taeniopygia guttata</i>	756	1e-139
GH735145	细胞色素 P450 Cytochrome P450 family 4	<i>Cyphoma gibbosum</i>	797	4e-49
GR867679	丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serine protease inhibitor SPI3	<i>Chlamys farreri</i>	820	9e-67
GR867044	TNF 受体相关因子 TNF receptor-associated factor 3	<i>Ciona intestinalis</i>	324	2e-25
GR867258	核糖体蛋白 L3 Ribosomal protein L3	<i>Chlamys farreri</i>	817	5e-66
GR867732	核糖体蛋白 L32 Ribosomal protein L32	<i>Argopecten irradians</i>	588	2e-71
GR867696	核糖体蛋白 L7a Ribosomal protein L7a	<i>Argopecten irradians</i>	794	1e-136
GR867680	核糖体蛋白 L4 Ribosomal protein L4	<i>Bos taurus</i>	839	1e-116
GR867024	核糖体蛋白 L19 Ribosomal protein L19	<i>Argopecten irradians</i>	740	9e-68
GR867800	核糖体蛋白 L9 Ribosomal protein L9	<i>Argopecten irradians</i>	635	1e-100
GR867738	线粒体核糖体蛋白 S6 Mitochondrial ribosomal protein S6	<i>Aedes aegypti</i>	774	2e-18

2.3.3 虾夷扇贝文库中微卫星筛选及 EST-SSR 引物设计 通过构建虾夷扇贝的 cDNA 文库和 EST 测序, 筛选多态性微卫星标记。在 2 007 条单基因簇中, 查找到 74 个重复序列, 隶属于 69 个 EST 序列, 含微卫星的 EST 占 EST 总数的 1.78%。两碱基重复序列

30 个, 占重复序列总数的 40.54%, (AT)_n 类型最常见; 三碱基类型的 25 个, 占 33.78%, (AAC)_n、(GAT)_n 类型最多; 四碱基类型只有 1 种, 五碱基和六碱基分别有 14 个和 4 个 (表 3)。

表3 虾夷扇贝2种组织EST文库中筛选的微卫星序列
Tab. 3 Microsatellite sequences exploited from two EST libraries of Japanese scallop

类型 Type	重复模式 Motif model	重复次数 Repeat time	比率/% Ratio
二碱基重复序列 2 bp repeat core	8 (GA) _n , 12 (AT) _n , 6 (TA) _n , 2 (CT) _n , 1 (TC) _n , 1 (GT) _n	30	40.54
三碱基重复序列 3 bp repeat core	4 (AAC) _n , 2 (AAG) _n , 1 (GCC) _n , 1 (ACA) _n , 1 (ATG) _n , 1 (AGG) _n , 1 (ATA) _n , 1 (GAG) _n , 1 (GAC) _n , 1 (GCA) _n , 1 (CGT) _n , 4 (GAT) _n , 1 (TCA) _n , 1 (GTC) _n , 1 (GTG) _n , 1 (CCA) _n , 2 (TGA) _n	25	33.78
四碱基重复序列 4 bp repeat core	(ATAA) _n	1	1.35
五碱基重复序列 5 bp repeat core	1 (AAATA) _n , 1 (AGATA) _n , 1 (ATGAC) _n , 2 (ATTTT) _n , 1 (CACGG) _n , 1 (GAAAA) _n , 1 (GGGAC) _n , 1 (TAGAG) _n , 1 (TATAT) _n , 1 (TATTT) _n , 1 (TTTGT) _n , 1 (TTTTG) _n , 1 (TCAAT)	14	18.92
六碱基重复序列 6 bp repeat core	1 (CATATT) _n , 1 (CTACCA) _n , 1 (TAACCC) _n , 1 (AAACAA) _n	4	5.41

69条含有微卫星的EST序列中,29条没有找到合适的引物,40条EST序列可通过Primer Premier 5.0设计引物(表4)。

3 讨论

3.1 虾夷扇贝2种组织cDNA文库的构建与质量测定

自从1976年Hofetetter等^[12]成功构建了第一个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^[13-15]。为了得到具有研究价值的编码基因,尤其是一些与扇贝类免疫防御机制相关的基因,本研究选用SMART方法构建了虾夷扇贝外套膜和肾脏2种组织全长cDNA文库。从琼脂糖凝胶电泳检测结果来看,所提取的RNA完整性较好。2种组织cDNA文库的库容量分别为

2.30×10^6 CFU/mL和 1.20×10^6 CFU/mL,表明所建cDNA文库的质量符合要求;其次,用PCR法随机检测插入片段,大部分片段长度都大于500 bp,平均长度大于1 000 bp,满足筛选基因的要求。

3.2 虾夷扇贝2种组织cDNA文库中免疫防御基因功能分析

通过同源性序列比对,共有659个单基因簇获得了基因注释,其中26条为未知功能基因,对余下的633条单基因簇进行功能分析,发现多种与细胞免疫和体液免疫相关的基因,如溶菌酶、凝集素和大防御素等。对相关基因进行分析、克隆、表达,在抗病新品种的研究和疾病预防上具有重要的应用价值。

软体动物的水解酶在清除异物的过程中发挥着重要的作用^[16],当软体动物受到异物侵染后,吞噬

表4 虾夷扇贝EST文库中筛选的部分微卫星引物序列及参数
Tab. 4 Characters and sequences of some screened microsatellite primers in two EST libraries of Japanese scallop

基因登录号 Accession No.	重复区序列 Repeat motif	引物序列(5' -3') Primer sequence(5' -3')		片段大小/bp Size
GH734907	(GAC) ₅	F: GGTGGATTTCGCGTCATTCGTT	R: GCGCAATGGCTTACCGGC	115
GH735162	(agg) ₅	F: GTATTCCAACGTGTCCGATG	R: CTCGACCTGTCCCACGG	127
GR867325	(aag) ₅	F: CACAGAAACTCCAGCCTACC	R: TACCAGACACTCTGTCTATCCCT	153
GH735343	(ta) ₈	F: GTAGAGTTATCACGGAGAAG	R: GTATCACAGAGCATTAACC	185
GH735944	(at) ₉	F: CTGCAGGCTGGAATAATTG	R: CAGGACATGAACATTTTTACTA	231
GH735737	(gca) ₅	F: AAGGACAGATTCACCATGTGCGAG	R: TTTTACTGGCCTGGTGGACTGGA	254
GH735688	(tc) ₉	F: AGGAAGTGGATAAGGACTTCAAT	R: TGCTGTAGTGAGCCGACCATAAC	254
GH735721	(aac) ₈	F: TGTCAAAAGTTCAAGGTTAGGTC	R: GGTCTTACAAAATACGGGGATGC	152
GH735689	(ta) ₇	F: GATGACGCAATAAATATGCAAGT	R: AGGTCAATAAATGAAAACATTGG	254

细胞可迅速合成脂肪酶,随后释放到血清中,对入侵细菌的脂质成分进行水解,达到清除异物的目的^[17]。同样属于水解酶类的碱性磷酸酶不仅能够参与膜运输调节和转磷酸作用,同时对维持体内适宜的钙磷比例和分泌角蛋白等促使软体动物贝壳形成也有重要的作用^[18]。

溶菌酶是一种具有杀菌作用和免疫功能的效应分子,可诱导调节机体其他免疫因子的合成与分泌,协同其他免疫因子在机体的天然免疫中发挥重要作用。在海洋贝类中,溶菌酶除了具有免疫防御功能外,还具有消化贝类滤食的海洋细菌的功能^[19]。

胰蛋白酶家族的丝氨酸蛋白酶及其抑制因子在无脊椎动物的免疫应答中起着核心作用,它们的协同作用不但与信号转导和级联放大有关,还可导致非特异性免疫防御机制的激活和抗菌肽的合成^[20-21]。丝氨酸蛋白酶抑制剂(SPI)是对丝氨酸蛋白酶有抑制活性的一类蛋白质,其通过与靶酶相互结合形成稳定的复合体,来防止机体内丝氨酸蛋白酶的有害水解激活,是生物体内免疫系统的重要组成部分。

软体动物体内的超氧化物歧化酶(SOD)、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^[22-23]发挥重要的调节功能。

凝集素是所有免疫防御体液因子中重要的模式识别蛋白,它通过结合病原表面上的特异糖基来介导抗原识别。目前已经在哺乳动物中克隆并鉴定了150多种C型凝集素,在多种无脊椎动物,如海胆^[24]、海参(*Cucumaria echinata*)^[25]、栉孔扇贝(*Chlamys farrei*)^[26]中也已有报道。

防御素是一类抗微生物肽,一般由15~20个氨基酸残基组成,包括6至8个保守的半胱氨酸残基。国内外学者在虾、贻贝、菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinensis*)^[27-28]中发现,防御素分子可以直接作用并杀死细菌、真菌和病毒等病原微生物,除此之外,防御素还具有细胞毒、免疫调节以及创伤和神经损伤修复等多种生物学活性。

3.3 虾夷扇贝 cDNA 文库中 EST-SSR 筛选

目前在虾夷扇贝微卫星研究中,获取微卫星的一般方法是通过微卫星核心序列进行探针杂交或以核心重复序列为引物进行PCR筛选^[29-30]。近年来,有些学者通过已有的ESTs数据库或构建cDNA文库来获得含有微卫星的序列并且设计引物对贝类微卫星标记进行筛选^[31]。EST序列仅仅反映了转录加工后的mRNA信息,除去了许多内含子和其他序列,因此并不能反映基因组DNA的真实信息,但与其他筛选微卫星的方法相比,从ESTs中筛选微卫星操作比较简单,能够节省人力和物力。

本研究共获得74个重复序列,隶属于69个EST序列,含微卫星的EST占EST总数的1.78%。李红蕾等^[31]和Wang等^[32]从栉孔扇贝ESTs文库中发现42个微卫星序列,占ESTs总数的0.60%。同期构建的海湾扇贝(*Argopecten irradians*)EST中的微卫星序列有76个,占EST总数的1.43%。相比之下,本研究得到的微卫星比例较高。

由于本研究构建的cDNA文库反映的是编码区序列特征,存在于编码区的微卫星序列对于基因结构和功能都有重要的影响;由于ESTs是功能基因的表达片段,在其中发现的微卫星直接和功能基因相关,也有可能和一些生产性状相关联,这些特点对以后的遗传图谱构建以及标记辅助选育都有很高的应用价值。

参考文献:

- [1] Heath W A. Developments in shellfish culture in British Columbia [J]. J Shellfish Res, 1995, 14: 228.
- [2] Bower S M, Blackburn J, Meyer G R. A new and unusual species of Perkinsus pathogenic to cultured Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, in British Columbia, Canada [J]. J Shellfish Res, 1997, 16(1): 333.
- [3] 孙虎山,李光友. 硒多糖和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种抗氧化酶活力的影响[J]. 中国海洋药物, 2000, 19(5): 20-23.
- [4] 孙虎山,李光友. 硒化卡拉胶和酵母葡聚糖对栉孔扇贝血淋巴中两种水解酶活力的影响[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 245-249.
- [5] 刘维青,倪多娇,宋林生,等. 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)金属

- 硫蛋白基因的克隆与分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 444-449.
- [6] 邹慧斌, 宋林生, 胥炜, 等. 海湾扇贝g型溶菌酶基因cDNA的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2005, 15(7): 101-106.
- [7] Nilsen I W, Myrnes B. The gene of chlamysin, a marine invertebrate-type lysozyme, is organized similar to vertebrate but different from invertebrate chicken-type lysozyme genes [J]. Gene, 2001, 269(1-2): 27-32.
- [8] Nilsen I W, Overbo K, Sandsdalen E, et al. Protein purification and gene isolation of chlamysin, a cold-active lysozyme-like enzyme with antibacterial activity [J]. FEBS Lett, 1999, 464(3): 153-158.
- [9] 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]. Nucl Acids Res, 1997, 25: 3389-3402.
- [10] 费来华, 邵雁群, 李赞, 等. 栉孔扇贝不同组织SOD、CAT、MPO活力的比较分析[J]. 海洋湖沼通报, 2008, 3: 128-132.
- [11] Weber J L. Informativeness of human (dC/dA)_n(dG/dT)_n polymorphisms [J]. Genomics, 1990, 7: 524-530.
- [12] Hofstetter H, Schambeck A, van den Berg J, et al. Specific excision of the inserted DNA segment from hybrid plasmids constructed by the poly(dA) and poly(dT) method [J]. Biochim Biophys Acta, 1976, 454: 587-591.
- [13] 朱文漓, 顾继锐, 辜文博, 等. 草鱼胞质苹果酸脱氢酶(cMDH)的序列克隆及分析[J]. 淡水渔业, 2008, 38(4): 66-72.
- [14] Cong M, Ni D, Song L, et al. Molecular cloning, characterization and mRNA expression of peroxiredoxin in Zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. Mol Biol Rep, 2008, 36(6): 1451-1459.
- [15] 谭晓风, 陈鸿鹏, 张党权, 等. 油茶FAD2基因全长cDNA的克隆和序列分析[J]. 林业科学, 2008, 44(3): 70-75.
- [16] Pipe R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis* [J]. Histochem J, 1990, 22: 595-603.
- [17] Cheng T C, Yoshino T P. Lipase activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (mollusca) challenged with bacterial lipids [J]. Invertebr Pathol, 1976, 28: 143-146.
- [18] 谢莉萍, 林静瑜. 合浦珠母贝碱性磷酸酶的分离纯化与性质研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(10): 37-44.
- [19] Hikima S. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species [J]. Gene, 2003, 316: 187.
- [20] Jiang H, Kanost M R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods [J]. Insect Biochem Mol Biol, 2000, 30: 95-105.
- [21] LeMosy E K, Hong C C, Hashimoto C. Signal transduction by a protease cascade [J]. Trends Cell Biol, 1999, 9: 102-107.
- [22] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 259-265.
- [23] 孙虎山, 李光友. 栉孔扇贝血淋巴中酚氧化物和髓过氧化物酶活性[J]. 中国水产科学, 1999, 6(4): 9-13.
- [24] Giga Y, Ikai A, Takahashi K. The complete amino acid sequence of echinoidin, a lectin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. Homologies with mammalian and insect lectins [J]. J Biol Chem, 1987, 262(13): 6197-6203.
- [25] Hatakeyama T, Sato T, Taira E, et al. Characterization of the interaction of hemolytic lectin CEL-111 from the marine invertebrate, *Cucumaria echinata*, with artificial lipid membranes; in involvement of neutral sphingoglycolipids in the pore-forming process [J]. J Biochem, 1999, 125: 277-284.
- [26] 胥炜, 王昊, 宋林生, 等. 栉孔扇贝c型凝集素基因的克隆与表达研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(1): 83-88.
- [27] 魏玉西, 郭道森, 李荣贵, 等. 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinesis*)血浆中防卫素的纯化及其抑菌功能[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(12): 1145-1148.
- [28] 余兴邦, 郭锁链, 乌翠兰, 等. 防御素研究进展[J]. 动物医学进展, 2006, 27(8): 47-51.
- [29] 李春艳, 丁君, 常亚青, 等. 虾夷扇贝微卫星标记的分离及其养殖群体的遗传结构分析[J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 39-46.
- [30] Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, et al. Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study [J]. Mar Biotechnol, 2005, 7(6): 713-728.
- [31] 李红蕾, 宋林生, 王玲玲, 等. 栉孔扇贝EST中微卫星标记的筛选[J]. 高技术通讯, 2003, 12: 72-75.
- [32] Wang X, Song B, Qiu X. Development of EST-SSRs in scallop (*Patinopecten yessoensis*) from sequence database [J]. Conserv Genet, 2009, 10(4): 1129-1131.

Construction of cDNA libraries from mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and ESTs analysis

LI Yunfeng¹, LIU Weidong¹, GAO Xianggang¹, LI Wenji¹, LIU Ying^{1,2}, FU Liyuan^{1,2}, LI Hongjun¹, WANG Jian^{1,2}, BAO Xiangbo¹, HE Chongbo¹

(1. Liaoning Ocean and Fishery Science Research Institute, Liaoning Key Laboratory of Marine Fishery Molecular Biology, Dalian 116023, China; 2. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)

Abstract: The cDNA libraries of mantle and kidney of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) were constructed with SMART cDNA library construction kit. The mantle and kidney libraries have high library titers of 2.30×10^6 and 1.20×10^6 CFU/mL, respectively. The recombined efficiency of each cDNA library exceeds 98%, with an average insert size of 1 kb. Total 4 009 clones from two libraries were randomly picked out and sequenced from the 5' end using a T7 universal primer, and 3 884 raw sequences of the ESTs were obtained and then assembled into 2 007 unigenes including 363 contigs and 1 644 singletons. These genes exhibited homology with those having known functions. Many genes were related to immune functions, such as lipase, C-type lectin, superoxide dismutase, goose-type lysozyme, serine protease inhibitor and big defensin. Sixty-nine microsatellite-containing ESTs were identified from the 2 007 unigenes by using the online bioinformatics software SSRIT. Based on the flanking sequences of the microsatellite loci, 40 pairs of microsatellite primers were designed. The successful construction of cDNA libraries from Japanese scallop made the bases of further analysis of ESTs functional gene discovery, and cloning and screening polymorphic EST-SSR primers. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (3): 578–585]

Key words: *Mizuhopecten yessoensis*; cDNA library; immune-relevant gene; EST-SSR

Corresponding author: HE Chongbo. E-mail: hechongbo@hotmail.com.