

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00222

虾夷马粪海胆性腺 cDNA 文库构建及部分 EST 序列分析

丁君, 孙巍, 常亚青

大连海洋大学, 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 应用Gubler-Hoffman cDNA 文库技术, 构建虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)性腺cDNA文库。测试结果表明, 其库容量为 2.10×10^6 PFU/mL, 长度范围在 0.5~4.2 kb, 插入片段平均长度为 1.4 kb, 达到建库要求。对虾夷马粪海胆cDNA克隆测序, 将获得的 819 条EST序列与NCBI数据库进行BLAST比对, 获得了 65 个有研究价值的 EST 序列和 cDNA 克隆, 其 EST 序列已提交到 GenBank, 序列号分别为 GO448010–GO448016、GR410172–GR410229, 虾夷马粪海胆性腺cDNA文库的成功构建, 使短期内获得大量调控海胆性腺生长和营养性状的关键词表达信息成为可能, 为进一步开发海胆的生物资源提供参考。[中国水产科学, 2011, 18(1): 222–229]

关键词: 虾夷马粪海胆; cDNA; 表达序列标签

中图分类号: Q959.26; S917

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2011)01–0222–08

海胆属于棘皮动物门(Echinodermata)、游在亚门(Eleutherozoa)、海胆纲(Echinoidea), 是 1 种营养、药用和科研价值很高的海洋动物。目前主要的经济海胆种类有大连紫海胆(*Strongylocentrotus nudus*)和虾夷马粪海胆(*Strongylocentrotus intermedius*)。海胆的性腺营养丰富, 富含多种类固醇, 海胆卵黄还含有大量动物性腺特有的结构蛋白、磷脂等活性物质。加强对海胆性腺生长和生物活性物质的分子生物学研究, 获得调控海胆性腺生长和营养性状的关键基因, 对海胆的遗传育种和增养殖研究具有重要意义。2006 年 11 月美国绘制完成紫球海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)基因组序列草图, 分析基因序列发现, 海胆基因组编码了大约 23 300 的个基因。但对海胆性腺生长和营养性状相关功能基因的研究还几乎处于空白状态。

自Hofstetter等^[1]1976 年首例cDNA克隆问世以来, 构建cDNA文库已成为研究功能基因组学

的基本手段之一。通过构建cDNA表达文库不仅可以提供构建分子标记连锁图谱的所用探针, 而且可以用于分离全长基因进而开展基因功能研究。对海洋生物进行大规模cDNA测序不仅可以检测到许多已知的有价值的功能基因, 更可以发现许多新的未知基因。国内外已针对中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的不同组织^[2–4]、扇贝^[5–8]、光棘球海胆(*Strongylocentrotus nudus*)^[9]等多种海洋生物上构建了cDNA文库。近年来, 表达序列标签(EST)技术发展迅速, 已成为从基因文库中获得新基因信息的一种快捷有效手段^[10]。海洋生物EST数据库的构建是一项重要的基础性工作, 对于充分利用中国海洋资源具有重要的科研价值及广阔的应用前景。

虾夷马粪海胆又称中间球海胆(*Strongylocentrotus intermedius*), 是中国北方最重要的经济海胆, 本研究构建了其性腺 cDNA 文库, 并开展了 EST 测序分析, 为从分子水平研究海胆性腺组织

收稿日期: 2009–12–23; 修订日期: 2010–02–05.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA10A411); 国家自然科学基金项目(30972269); 辽宁省创新团队项目(2007t017); “百千万人才工程”资助项目(2008921059).

作者简介: 丁君(1973–), 副研究员, 博士, 硕士生导师, 研究方向为海洋动物遗传育种与繁育. E-mail: dingjun1119@dlou.edu.cn

通讯作者: 常亚青(1967–), 教授, 博士生导师. Tel:0411-84762695; E-mail: yqchang@dlou.edu.cn

的活性组分和作用机理奠定了基础,同时运用生物信息学方法,以期从文库中筛选出有开发价值的功能基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用虾夷马粪海胆为雄性,2龄,取自大连海洋大学农业部海洋水产增养殖学与生物技术重点开放实验室。

1.1.2 质粒和菌种 pBluescript II SK (+)购自大连宝生物工程公司; *E. coli* DH10 β 为本实验室保存。

1.1.3 试剂和酶 cDNA Library Construction Kit 为大连宝生物工程公司产品。焦碳酸二乙酯(DEPC)、MOPS、氨苄青霉素钠盐购自上海 Sangon 公司, *Sfi*I 购自大连宝生物工程公司,各种限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司, *Taq* DNA 聚合酶为本实验室保存,其他产品为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 和 mRNA 的分离提取 取虾夷马粪海胆性腺组织 0.1 g,迅速转移至液氮预冷的研钵中,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,经琼脂糖电泳检测总 RNA 质量,使用 TaKaRa 公司的 ligotex-dT30<Super>mRNA Purification Kit 分离系统分离 mRNA,再经琼脂糖电泳检测 mRNA 质量。

1.2.2 cDNA 双链的合成 参照 TaKaRa 公司的 cDNA Library Construction Kit 操作说明,利用反转录酶 M-MLV, Oligo(dT)₁₈ Anchor Primer 和 5-methyl dCTP 合成第一链 cDNA (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。

1.2.3 cDNA 文库构建及鉴定 使用 T4 DNA Polymerase 将双链 cDNA 末端平滑化,与带有 *Eco*R I 酶切位点的 Adaptor 连接,再使用 *Not* I 进行酶切,经 CHROMA SPIN+TE-1000 除去短链 cDNA (<400 bp),最后将带有 *Eco*R I -*Not* I 酶切

位点的 cDNA 片段与 *Eco*R I -*Not* I 酶切载体 pBluescript 进行连接。电转化至 *E. coli* DH10 β 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 μ g 氨苄青霉素的琼脂平板上,取 1 μ L、10 μ L 和 100 μ L 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。确认转化效率后,将剩余的转化产物涂布于直径 15 cm 的 LB/Amp 平板培养基上,控制每个平板产生约 5 万个以下的克隆,37℃ 过夜培养;向平板中生成的菌落中加入 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。构建的 cDNA 文库重组率测定采用蓝白斑筛选方法,即向含有噬菌体和 *E. coli* XL1-Blue 混合液的上层琼脂中分别加入 50 μ L 100 mmol/L 的 IPTG 和 X-Gal,于 90 mm 平板上铺板,置 37℃ 孵育过夜,分别计算蓝色噬菌斑和无色噬菌斑数,并计算其百分比。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。

1.2.4 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 μ L 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 μ L 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。

1.2.5 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,由北京六合华大基因生物公司测序。

1.2.6 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。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。

将测序后的虾夷马粪海胆性腺 EST 序列登录 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站, 应用 BLASTn(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 软件将各序列与紫球海胆相应序列进行比对。

2 结果与分析

2.1 虾夷马粪海胆性腺 cDNA 文库质量检测

2.1.1 总 RNA 的提取和 mRNA 提取 使用 RNAiso Reagent 试剂盒提取海胆性腺组织的总 RNA, 经 1% 甲醛变性胶电泳检测, 可见清晰的 28S、18S 和 5S 3 条 RNA 条带(图 1)。表明组织总 RNA 没有降解, 提取的 RNA 质量较高。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 2), 说明 mRNA 的提取质量较好。

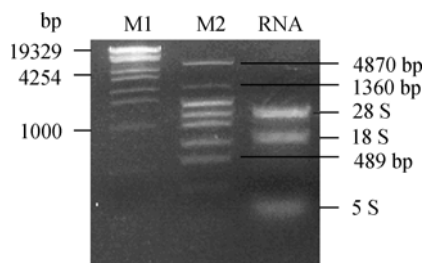


图 1 虾夷马粪海胆总 RNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker.

Fig.1 1.0% agarose gel electrophoresis of total RNA of *Strongylocentrotus intermedius*

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker.

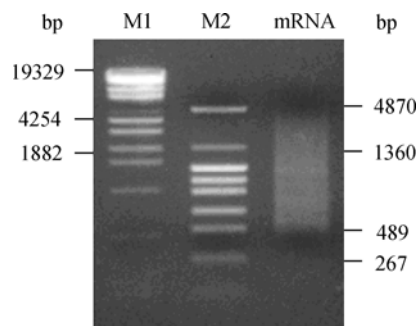


图 2 虾夷马粪海胆 mRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker.

Fig.1 1.0% agarose gel electrophoresis of mRNA of *Strongylocentrotus intermedius*

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker.

2.1.2 海胆性腺 cDNA 表达文库的构建和鉴定 经测算, 该虾夷马粪海胆 cDNA 文库的滴度为 2.10×10^6 PFU, 以蓝白斑筛选检测重组率 > 95%。任意挑选了 30 个菌落进行 PCR 反应检测插入片段长度。部分电泳结果显示, 其中全部含有插入片段, 插入片段的长度范围在 0.5~4.2 kb, 平均插入片段长度在 1.4 kb。以上结果说明, 所构建的虾夷马粪海胆的 cDNA 文库在库容量和插入片段大小等方面均符合文库构建的质量标准, 能够满足测序的要求 (图 3)。

2.2 虾夷马粪海胆性腺 cDNA 的序列测定和分析

序列经 Blastn 初步同源检索分析表明, 已获得了 819 个海胆 EST 序列, 其中有 92% (753 个) 与已知基因和表达序列标签同源, 并将其中的 65 个 EST 序列提交到 GenBank (登录号 GO448010–GO448016, GR410172–GR410229) (表 1)。8% (66

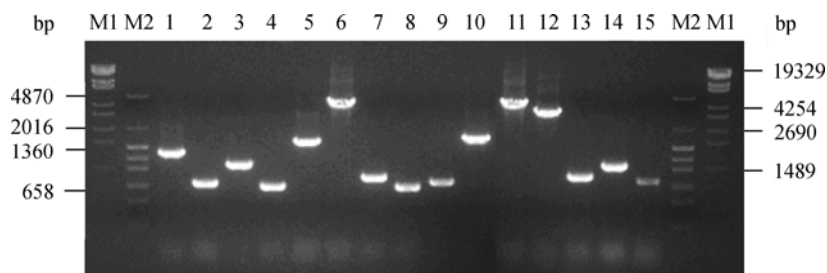


图 3 虾夷马粪海胆性腺 cDNA 文库插入片段的 PCR 验证结果

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker; 1–15: 插入片段.

Fig.3 PCR identification of inserted segments in constructed *Strongylocentrotus intermedius*' gonad cDNA library

M1: λ-EcoT14 I marker; M2: pHY marker; 1–15: inserted segments.

表 1 虾夷马粪海胆 cDNA 克隆与 NCBI 同源序列比对分析结果

Tab.1 BLASTn analysis of cDNA clones from gonad cDNA library of *Strongylocentrotus intermedius*

登录号 accession no.	推测同源的基因 putative gene	同源性/% identity
GO448010	层黏连蛋白 34/67kD laminin binding protein	97
GO448011	翻译延伸因子 translation elongation factor1B gamma subunit	95
GO448012	精子活化肽蛋白 speract protein	93
GO448013	主要卵黄蛋白 major yolk protein	96
GO448014	延伸因子 elongation factor 1 alpha	97
GO448015	细胞外基质分子 HLC-32	95
GO448016	ATP 合成酶 ATP synthase beta subunit	98
GR410172	p62 有丝分裂器蛋白 mitotic apparatus protein	90
GR410173	葡聚糖酶 Pr22 protein	96
GR410174	程序性细胞死亡 4 programmed cell death 4	96
GR410175	电压依赖性阴离子通道 2 voltage-dependent anion channel 2	98
GR410176	铁蛋白 ferritin	96
GR410177	金属硫蛋白 metallothionein	95
GR410178	凝溶胶蛋白 gelsolin	97
GR410179	肌球蛋白 muscle actin	97
GR410180	铁蛋白 ferritin	96
GR410181	SMAD 基因 SMAD5	97
GR410182	细胞色素氧化酶 cytochrome oxidase subunit I	99
GR410183	GTP 结合蛋白 GTP-binding nuclear protein	96
GR410184	亲环素蛋白 cyclophilin	93
GR410185	D-乳酸脱氢酶 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	95
GR410186	胸腺肽 thymosin beta	92
GR410187	皮质泡蛋白 32kDa cortical vesicle protein CV34-38 precursor	85
GR410188	类核糖体蛋白 L10QM-like protein	98
GR410189	电压依赖性阴离子通道 voltage-dependent anion channel 2	98
GR410190	脂肪酸结合蛋白 fatty acid-binding protein 2, liver	94
GR410191	真核细胞翻译起始因子 eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10	90
GR410192	纤连蛋白 fibropellin Ia	95
GR410193	核蛋白家族 A nucleolar protein family A, member 2	91
GR410194	皮质泡蛋白 cortical vesicle protein CV34-53 precursor	87
GR410195	Y-Box 因子 Y-Box factor	99
GR410196	Atb0 蛋白 Atb0+ protein	90
GR410197	单磷酸鸟苷合成酶 GMPS protein	96
GR410198	核定位信号 nuclear pore-targeting complex component of 58 kD	97
GR410199	三甲胺乙内酯高半胱氨酸转甲基酶 betaine homocysteine methyltransferase	91
GR410200	组蛋白去乙酰化酵素 4 号 class 4 HDAC protein	94
GR410201	热休克蛋白 84kD heat shock protein 84kD	88
GR410202	Rps9-prov 蛋白 Rps9-prov protein	97
GR410203	增殖细胞核抗原 Pcn protein	95
GR410204	CGI-119 蛋白 CGI-119 protein	95
GR410205	表皮生长因子 epidermal growth factor II precursor	95
GR410206	糖原分枝酶 glucan, branching enzyme 1	94
GR410207	SMARCB1 基因 SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c	97

续表 1

登录号 accession no.	推测同源的基因 putative gene	同源性/% identity
GR410208	组蛋白 histone H2 A.F/Z	96
GR410209	富含亮氨酸重复序列 leucine rich repeat containing 9	94
GR410210	RPL35 蛋白 RPL35 protein	95
GR410211	Hu/elav 蛋白 Hu/elav, transcript variant 2	98
GR410212	丝氨酸 - 精氨酸二肽含性剪切因子 arginine/serine-rich splicing factor 7	92
GR410213	Nek 蛋白 Nek protein	96
GR410214	环氧化物水解酶 epoxide hydrolase	94
GR410215	醌氧化还原酶 NAD(P)H:quinone oxidoreductase	95
GR410216	calcium storage protein ERcalcistorin/PDI	97
GR410217	谷胱甘肽过氧化酶 glutathione peroxidase	95
GR410218	泛素 ubiquitin	96
GR410219	14-3-3 同源蛋白 1433_CANAL 14-3-3 protein homolog, transcript variant 2	94
GR410220	MGC85582 蛋白 MGC85582 protein	93
GR410221	谷胱甘肽硫转移酶 glutathione S-transferase alpha-4	95
GR410222	阳离子氨基酸转运体 solute carrier family 7	94
GR410223	Sec23 蛋白 Sec23 protein	98
GR410224	腺苷高半胱氨酸水解酶 adenosylhomocysteinase	97
GR410225	臂动力蛋白 LC6 outer arm dynein LC6	97
GR410226	Vasa 基因 Vasa	95
GR410227	皮质泡蛋白 CVp18	93
GR410228	磷酸甘油醛脱氢酶 glyceraldehydphosphate dehydrogenase, transcript variant 1	94
GR410229	翻译起始因子 4E eukaryotic translation initiation factor 4E	97

个) 与已知基因和表达序列标签均无同源性, 为新的表达序列标。经同源检索分析, 与紫球海胆同源性最高的为 GR410195Y-box 因子, 同源性高达 99%; 与紫球海胆同源性最低的是 GR410194 皮质泡蛋白, 同源性为 88%, 说明此文库的 EST 序列与紫球海胆相应序列存在一定程度的差异。

对 EST 进行分析, 根据重复序列两端的保守序列利用 Primer Premier 3.0 软件进行引物设计, 除去一些侧翼序列较短不能设计引物外, 共获得 28 个微卫星序列, 引物见表 2。EST-SSR 可作为探针用来构建分子标记连锁图谱, 对进一步开发海胆的生物资源提供了很好的参考。

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。cDNA文库的质量主要表现在 2 个方面: (1)文库的库容。为满足筛选到低丰度的mRNA的要求, 一般文库的库容量要求不低于 1×10^6

PFU^[11], 本研究构建的虾夷马粪海胆性腺组织的cDNA文库库容量为 2.10×10^6 PFU, 已达到高质量的文库要求。(2)插入片段的长度。本研究所构建的文库插入片段为 0.5~4.2 kb, 且片段的平均长度大于 1.4 kb。综上所述, 本研究虾夷马粪海胆性腺组织的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。

本研究运用生物信息学方法首次对虾夷马粪海胆的基因进行分析, 通过对虾夷马粪海胆性腺cDNA文库的EST序列测定及同源性比对, 得到了一些有研究价值的基因序列。如精子活化肽蛋白、主要卵黄蛋白(MYP)的基因片段。层黏连蛋白结合蛋白、HLC-32 蛋白、ATP 合酶 β 亚基的部分基因序列, 还有一些功能尚未确定的核酸序列等, 这些片段在海胆中尚未见报道, 有望成为新的有应用价值的功能基因。近年来, 对海胆胚胎发育进行了大量的研究, 但从分子水平上对其功

表 2 虾夷马粪海胆部分微卫星序列
Tab.2 Some microsatellite primer pairs for *Strongylocentrotus intermedius*

编号 no.	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')	重复基序 repeat motif	退火温度/ T_m	产物大小/bp production size
SUC-1	F: TGCCAGCGTCTACGAAAGTG R: TGGGTTTGATGCGAGTGC	(CCG) ₄	57.8 57.9	312
SUC-2	F: AAGAACTTGCCATTCATCAC R: GATAGGCTACTTTATTGGTCG	(AG) ₈	52.2 51.9	278
SUC-3	F: CCTATGTGACTCGGCAAC R: CCTCACTAAAGGGAACAAA	(GCGGGT) ₅	50.9 50.0	551
SUC-4	F: AGTGCGAAGCCCTTGTCTA R: TGGAATCTGCGTGGAATAAC	(TGG) ₄	55.7 55.9	457
SUC-5	F: GCGAAGATGAGAAGCGAATGA R: CAGCCTGAATGGCAAATGG	(GC) ₆	60.5 59.5	121
SUC-6	F: GTGTCACCACATCCCTCATT R: CTTCCAGCGACTCATCAACT	(TG) ₄	54.8 54.9	384
SUC-7	F: TGGGTGTATGCTTCCCTGTC R: TCTTCTCGCTGGTATTGGTTT	(CT) ₂₁	57.9 56.9	708
SUC-8	F: AAGTTGGGTAACGCCAGGGT R: CGCAATCAAGAAGAAGGACGA	(AG) ₆	60.9 60.5	298
SUC-9	F: CCATTAGGGCAATAACTCA R: ACAGCCGTAAACAAGTAGAAT	(AC) ₄	51.0 51.6	346
SUC-10	F: TCATCTTCCTCATCACCTCC R: GTCGTCTCGTGCGTATCG	(TGG) ₆	54.1 54.9	346
SUC-11	F: TCAAAGGGACCTGTGACGAG R: ATGGGTGACGACAAAGTAAAGAA	(AAG) ₄	58.0 58.5	422
SUC-12	F: CCTCCGCCACAGGGTAAT R: CATCCCTATGACTGACAACGC	(CA) ₆	57.8 57.9	341
SUC-13	F: TGGGTTTGATGCGAGTGCC R: GATGCCAGCGTCTACGAAAGTG	(GGC) ₄	62.3 60.7	314
SUC-14	F: CGTCCATTGCGCCATTCAGG R: CCAAGGCACTCGCATCAAAC	(AAC) ₄	61.8 61.3	387
SUC-15	F: CAATACGCAAACCGCCTC R: TCTGTTACCTCAGCCTTCT	(GCG) ₂	57.2 54.4	543
SUC-16	F: AATGGTGGTAGGCTGTTGTT R: TTCATCTGGTGCTGCGTC	(AAG) ₃	54.5 55.1	253
SUC-17	F: TTATCATAGGGCAAGTCCA R: TTAGATGTTGTGGACGAGTG	(TAT) ₄	51.0 51.1	330
SUC-18	F: TACTGGCTGCCTCTGGTCAT R: TCCGTTTACAATGTCTGATGCG	(GCT) ₄	57.8 61.1	477
SUC-19	F: AATGTCACCGATTAGCACTTT R: ATTCAGATAATACTGCCCTCGT	(AT) ₁₃	54.4 55.4	220
SUC-20	F: CCAGGTTTCTCGTCACACG R: GGCAAGTTCGGCATCATC	(CA) ₆	55.8 56.5	469
SUC-21	F: AAATGGCTTGTTGTATCAC R: GAGGTCAATCGGAGGAGA	(AAG) ₄	50.2 51.9	316
SUC-22	F: GCGAACCCTAAGGACTGATA R: AGCGAAGAGCCGCACGAT	(GT) ₄	54.6 61.4	169
SUC-23	F: CCCTTAGTTCCTTCATCAGC R: CGCCATTTACCACCAGAG	(GAT) ₄	54.1 54.2	289
SUC-24	F: TACTGGCTGCCTCTGGTCAT R: TCCGTTTACAATGTCTGATGCG	(GCT) ₅	57.8 61.1	477
SUC-25	F: GAGCATCCACTCTATCGGTCT R: GAGGCATCTGACGAGGGAG	(GCA) ₅	55.8 57.4	567
SUC-26	F: GTTGACGAATCGGCGTTGT R: AGGTCCTGTCCTGCTGTGGC	(GAA) ₅	63 62	239
SUC-27	F: TTCCAACCTTCGTCATCGTC R: CCTCCCGTGTTCGTCCTTT	(AG) ₈	58.1 57.3	315
SUC-28	F: CTTGGTGTCTACTTCTTCTTC R: CCTCACTAAAGGGAACAAA	(AG) ₆	50.7 50	145

能基因的报道较少。虾夷马粪海胆性腺 cDNA 文库的成功构建, 可以使基因资源得到永久的保存, 同时还可利用功能筛选、免疫学筛选 Southern 杂交等现代分子生物学技术寻找到与生长代谢相关功能基因, 为遗传育种打下基础。

在文库中还发现了调控海胆性腺生长和营养性状的基因。如翻译延伸因子 1A(EF1 α)、精子膜表面电压依赖性阴离子通道(VDAC)、亲环素 A(CyPA)等。EF1 α 是 1 个主要的翻译因子, 参与许多重要的细胞过程^[12]。磷酸肌醇途径是 1 个由

生长因子激活的信号转导级联放大反应^[13]。翻译延伸因子能和PLC的PH结构域相互作用,通过调节PLC活性,在磷酸肌醇信号传导途径中发挥作用。精子膜表面电压依赖性阴离子通道(VDAC)是精子膜上的 1 种重要的蛋白质通道,在调节精子代谢、维持精子膜内外离子平衡及信号转导中发挥重要的作用,对精子的获能和运动及受孕至关重要^[14]。VDAC的氨基酸链以极性、非极性交替排列为 β 折叠方式^[15-16],从而将孔道内部极性环境与非极性的膜区域分开,带电基团埋藏在亲水性孔道的内部。研究发现随着跨膜电压的改变,其传导性和离子选择性发生改变。VDAC的门控特性为其调控膜内外某些离子、ATP及其他代谢物提供通道,通过与膜上其他蛋白质的相互作用调节膜的通透性。CyPA是 1 种在生物界广泛存在、高度保守的蛋白质,参与蛋白质折叠、装配与运输^[17],同时也是 1 种氧化应激诱导分泌的生长因子。研究表明CyPA具有PPIase活性^[18],在氧化应激条件下介导活性氧介质对ERK1/2 的激活。虾夷马粪海胆性腺中富含的CyPA、EF1 α 等生长和生物活性物质的发现,对获得调控海胆性腺生长和营养性状的关键基因,及中国水产经济动物的遗传育种和增殖研究具有重要意义。

近年来,对虾夷马粪海胆的研究主要在养殖和食用功能上,而有关其基因水平上的报道较少,且多集中在虾夷马粪海胆微卫星的研究^[19]。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调控虾夷马粪海胆性腺生长和营养性状的基因,对进一步开发海胆的生物资源提供了很好的参考。对EST进行分析,还获得 28 个微卫星序列,EST-SSR可作为探针用来构建分子标记连锁图谱,下一步的工作是根据EST序列设计引物,以期获得全长的功能基因,为在分子水平上调控虾夷马粪海胆的生长奠定基础。

参考文献:

[1] 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.

[2] 王维新, 史成银, 黄捷. 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.

[3] 张晓军, 王兵, 张绍萍, 等. 中国对虾 6 种组织 cDNA 文库的构建[J]. 海洋学报, 2005, 27(5): 92-96.

[4] 黄晓, 周荣家. 中国对虾 cDNA 文库的构建[J]. 动物学报, 1998, 44(2): 237-241.

[5] 王崇明, 艾海新, 刘英杰, 等. 栉孔扇贝急性病毒性坏死症病毒 cDNA 文库的构建及部分序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 421-426.

[6] 吴龙涛, 宋林生, 胥炜, 等. 栉孔扇贝热休克蛋白 70 基因 cDNA 的克隆与分析[J]. 高技术通讯, 2003, 13(11): 75-80.

[7] 刘维清, 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): 444-450.

[8] 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): 101-107.

[9] 周遵春, 包振民, 董颖, 等. 光棘球海胆的主要卵黄蛋白 cDNA 序列分析[J]. 中国水产科学, 2006, 13(3): 352-359.

[10] 陈卓, 刘杰, 钱万强, 等. 表达序列标签(EST)分析及藻类 EST 文库的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1934-1937.

[11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2001: 319.

[12] 周冰, 曹诚, 刘传暄. 翻译延伸因子 1A 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007(2): 281-284.

[13] Yang W, Burkhart W, Cavallius J, et al. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(1): 392.

[14] 王增军, 张伟, 吴宏飞, 等. 人精子膜表面电压依赖性阴离子通道的初步研究[J]. 中华男科学杂志, 2007, 13(6): 498-501.

[15] Roman I, Figys J, Steurs G. Direct measurement of VDAC-actin interaction by surface plasmon resonance[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1758(4): 479-486.

[16] Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, et al. Properties of the permeability transition in VDAC1 mitochondria[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1757(5-6): 590-595.

[17] 涂剑, 严鹏科, 廖端芳. 亲环素 A 生物学功能的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005(2): 236-237.

[18] Jing Z G, Melaragno M G, Liao D F, et al. Cycrophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress[J]. Circ Res, 2000, 87(9): 789-796.

[19] 丁君, 李润玲, 常亚青, 等. 虾夷马粪海胆微卫星标记制备及对 3 个养殖群体的遗传多样性分析[J]. 分子科学学报, 2008, 24(3): 173-179.

Construction of cDNA library and partial ESTs analysis of *Strongylocentrotus intermedius*

DING Jun , SUN Wei, CHANG Yaqing

Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian 116023, China

Abstract: Sea urchin(*Strongylocentrotus intermedius*) is a species of commercial and ecological significance, and as a economic species, sea urchin has been demanded steadily in Europe and Southeastern area for a long time. Recent studies focused on the development of its genomic resources, which is a key step towards further investigation, identification of gene and gene networks involved in its economic characters. Efforts have been focused on genes that can affect expression of important economic traits, such as growth and nutritional traits related genes. In this study, a cDNA library of sea urchin has been constructed from gonad using Gubler-Hoffman cDNA library technique. Total RNA was extracted from the grounded frozen powder of gonad tissue by using acid-guanidine-phenol-chloroform (AGPC). Poly(A)⁺ RNA was isolated and purified by oligo(dT)₁₈ anchor primer containing *Not* I site. Both ends of the newly generated and polished double-stranded (ds) cDNA were attached by *Eco*R I adaptors and the ds cDNA was then restricted by *Not* I. The short cDNA (<400 bp) was removed by Spin Column. The library consisted of 2.10×10^6 PFU/mL colony forming units with average insert size of 1.4 kb, ranging from 0.5 kb to 4.2 kb and was quantified to construct a cDNA library. Eight hundred and fourteen ESTs were compared with sequences in GenBank database of NCBI using Blast search, among which 65 ESTs and cDNA clones had been identified. These identified ESTs were submitted to GenBank with accession number of GO448010–GO448016 and GR410172–GR410229. The cDNA library provides rich source for better understanding of functional genes in sea urchin, and thus will play an important role in further development of sea urchin research.[Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 222–229]

Key words: *Strongylocentrotus intermedius*; cDNA; expressed sequence tags

Corresponding author: CHANG Yaqing. Tel: 0411-84762695; E-mail: yqchang@dlou.edu.cn