

剑尾鱼肝脏cDNA文库的构建

刘坡^{1,2}, 李凯彬², 王芳², 刘春², 聂湘平³, 吴淑勤²

(1. 广东海洋大学, 广东 湛江 524088; 2. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380; 3. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510630)

摘要: 以暴露于 β -萘黄酮(β -Naphthoflavone, β -NF)中的剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)为研究对象, 采用SMARTTM (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) 技术, 成功构建了剑尾鱼肝脏cDNA文库。该文库约含有 4.2×10^7 个重组子, 重组效率达100%, 插入片段多在0.6~2.5 kb之间, 平均插入片段长度约1.3 kb, 扩增后文库滴度为 7.0×10^9 CFU/mL。随机挑取200个重组子进行测序检验, 共得到长度大于500 bp的Expression sequence tag (EST)序列187个, 对所测EST序列进行拼接, 得到16个重叠群(Contigs), 81个单拷贝EST, 总计单基因簇97个。结果表明, 剑尾鱼肝脏的全长cDNA文库已构建成功, 且质量较高, 从而为筛选剑尾鱼肝脏的功能基因全长序列奠定了基础。[中国水产科学, 2009, 16(4): 487-495]

关键词: 剑尾鱼; 肝脏; cDNA文库

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)04-0487-09

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)属硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Cyprinodontiformes)、胎鲈科(Poeciliidae)、剑尾鱼属, 原产地为墨西哥及危地马拉。1987年, 中国水产科学研究院珠江水产研究所就开始了剑尾鱼的定向培养和相关的实验动物化研究工作^[1]。目前剑尾鱼已通过全国水产原良种审定委员会的审定, 农业部第348号公告^[2]也明确了剑尾鱼RR-B系在水环境监测、水产药物安全性评价、动物疾病检验模型等不同领域的应用^[3-4]。由于近交剑尾鱼的遗传均一性较高, 加上饲养过程的营养标准化管理规范化, 作为一种标准化的实验材料, 保障了不同个体在应用中的反应一致性和实验的可重复性, 从而提高研究的总体水平。但是剑尾鱼的已知EST序列还相对较少, 许多功能基因以及可以在水环境监测中应用的基因数量更是有限, 因而限制了剑尾鱼的应用。

cDNA文库的构建是真核分子生物学研究的基

本手段之一, 目前已经广泛用于研究不同发育阶段基因表达的变化, 某特定发育期基因表达的情况, 克隆新细胞因子, 分离组织特异性基因等方面^[5-8]。构建剑尾鱼肝脏cDNA文库, 可以为下一步EST序列分析及代谢关键酶基因、环境污染物相关基因的克隆、表达等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

剑尾鱼20尾(雌性), 取自珠江水产研究所实验动物中心, 体长(56.39 ± 3.59) mm, 体质量(6.05 ± 1) g。试剂盒SV Total RNA Isolation System购自Promega公司, 试剂盒CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit购自Clontech公司, β -萘黄酮(β -Naphthoflavone)、MS-222、焦磷酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)购自Sigma公司, LA Taq酶、DNA Marker以及感受态细胞DH-5 α 购自TaKaRa公司, 质粒提取试剂盒

收稿日期: 2008-10-15; 修订日期: 2009-02-25.

基金项目: 科技部公益项目资助(2004DIB1J029).

作者简介: 刘坡(1984-), 男, 硕士, 从事水产动物病害免疫方面的研究. E-mail: back2003@163.com

通讯作者: 吴淑勤. E-mail: wushuqin001@21cn.com

TIANprep Mini Plasmid Kit购自TIANGEN公司,琼脂糖购自OXIOD公司, *E. coli* Pulse 电转化仪及电转化杯购自BIO-RAD公司。

1.2 方法

1.2.1 剑尾鱼肝脏总RNA的提取 取健康剑尾鱼, 22℃水温暂养2个星期后,暴露于 β -萘黄酮(100 $\mu\text{g/L}$)中,每隔1 d更换全部暴露液。7 d后,用MS-222(1:12 500, g/mL)将鱼麻醉,敲击头部致死,迅速解剖取肝脏,用DEPC水冲洗去血。同时从-70℃冰箱取出预冷的碾钵,按照试剂盒SV Total RNA Isolation System说明书,提取肝脏总RNA。

1.2.2 cDNA文库的构建

(1)cDNA第一链的合成 利用核酸蛋白检测仪测定肝脏总RNA的质量浓度为1 723.4 $\mu\text{g/mL}$,取1 μg 总RNA,加入SMART IV Oligonucleotide和CDS III/3' PCR Primer两条引物各1 μL ,用双蒸水补齐到5 μL 。混匀后短暂离心,72℃温浴2 min,冰上冷却离心管2 min,短暂离心,按顺序加入5 $\times$ First-Strand Buffer 2 μL , DTT (20 mmol/L) 1 μL , dNTP Mix (10 mmol/L) 1 μL , MMLV Reverse Transcriptase 1 μL ,反应体系共10 μL ,混匀后短暂离心,42℃温浴1 h,反转录合成cDNA第一条链。

(2)通过LD PCR扩增双链cDNA 取PCR反应小管,分别加入cDNA第一链产物2 μL ,10 $\times$ Advantage 2 PCR Buffer 10 μL ,50 $\times$ dNTP Mix 2 μL ,5' PCR Primer 2 μL , CDS III/3' PCR Primer 2 μL ,50 $\times$ Advantage 2 Polymerase Mix 2 μL ,用双蒸水补齐到100 μL ,混匀后短暂离心,进行PCR反应,反应条件为:95℃预变性1 min,95℃变性15 s,68℃复性延伸6 min,进行19个循环扩增双链cDNA,-20℃保存。

(3)蛋白酶K消化以及蛋白去除 取PCR反应小管,分别加入双链cDNA 50 μL ,蛋白酶K 2 μL ,混匀后短暂离心,45℃温浴20 min,灭活 Advantage 2 Polymerase Mix,再加入50 μL 双蒸水,然后加入100 μL 苯酚+氯仿+异戊醇(体积比25:24:1)混合液进行第一次蛋白抽提,轻柔地上下翻转2 min,14 000 r/min离心5 min,将上清液转移到0.5 mL离心管,弃中间层

以及下层溶液。再向含有上清液的0.5 mL离心管中加入100 μL 氯仿:异戊醇(体积比24:1)混合液进行第二次蛋白抽提,轻柔地上下翻转2 min,1 400 r/min离心5 min,将上清液转移到另一0.5 mL离心管,弃中间层以及下层溶液。向该上清液中分别加入乙酸钠(3 mol/L)10 μL ,糖原(20 $\mu\text{g/L}$)1.3 μL ,室温放置的95%乙醇260 μL ,立即14 000 r/min离心20 min,去除上清,保留沉淀,用80%乙醇洗涤沉淀1次,空气干燥10 min后溶于79 μL 双蒸水。

(4)*Stif*酶切 向上一步收集的79 μL cDNA溶液中分别加入10 $\times$ *Stif* Buffer 10 μL , *Stif* 酶10 μL ,100 $\times$ BSA 1 μL ,总反应体系为100 μL ,混匀后短暂离心,50℃酶切2 h。再加入1%的二甲苯青染料2 μL ,混合均匀。

(5)cDNA片段的分离 反复翻转CHROMA SPIN-400柱,混匀柱内的凝胶基质,去除其底部的盖子,将CHROMA SPIN-400柱垂直放置,待柱内的储存液滴完,向柱内加column buffer 700 μL ,滴定完成后,再向柱内加入经*Stif*酶切处理的cDNA与二甲苯青染料的混合溶液100 μL ,待混合溶液完全进入凝胶基质后,用100 μL 双蒸水清洗装混合溶液的0.5 mL离心管,将清洗液也一同加入到柱内,打开柱底部的盖子,进行滴定,滴定完成后,再向柱内加入column buffer 600 μL ,立刻收集每滴cDNA溶液到一个独立的1.5 mL离心管中,收集完成后,从每个离心管中取3 μL 进行琼脂糖电泳检测,取分子量大于500 bp的cDNA合并到一个离心管。向离心管中分别加入1/10倍体积的乙酸钠(3 mol/L),2.5倍体积的95%乙醇(-20℃预冷),糖原(20 $\mu\text{g/L}$),混合均匀,-20℃过夜,14 000 r/min室温离心20 min,去除上清,保留沉淀,空气干燥10 min后溶于7 μL 双蒸水。

(6)cDNA与pDNR-LIB载体的连接 取7个PCR反应小管,分别编号为L1、L2、L3、L4、L5、L6和L7。如表1所示,分别向PCR反应小管中加入各种反应组分,混匀后短暂离心,16℃连接过夜,各管分别加入15 μL 去离子水稀释溶液离子浓度。

表1 不同浓度 cDNA 与 pDNR-LIB 质粒连接设计表
Tab. 1 Ligation between pDNR-LIB and different cDNA concentration

组分 Component	试管编号 Tube no.						
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
cDNA	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75
pDNR-LIB	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
10× 连接缓冲液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
ATP	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
T ₄ 连接酶	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
双蒸水	2.25	2.0	1.75	1.5	1.25	1.0	0.75
合计 Total	5	5	5	5	5	5	5

(7) 转化以及滴度测定 感受态细胞(−70 ℃保存)置冰上融化,分别向7个1 mm电转杯(−20 ℃预冷)中加入感受态细胞49 μL,各组连接产物1 μL,进行电转化,转化条件: Voltage 1.5 kV, CuvetteGap 0.1 cm, Fieldstrength 15 kV/cm, Capacitor 25 μF, Resistor 200。再向各电转杯中分别加入950 μL SOC液体培养基(37 ℃预热),将电转杯中的溶液分别转移到7个10 mL离心管中,37 ℃ 225 min摇菌复苏1 h,每管取150 μL复苏菌液,涂布到3个含有氯霉素(35 μg/mL)抗性的90 mm LB平板,每个平板涂布50 μL,过夜培养,分别对重组子进行计数。

(8) cDNA文库的鉴定 随机挑取200个单菌落,在含有氯霉素(35 μg/mL)抗性的SOC培养基中37 ℃ 200 r/min过夜培养,进行菌液PCR反应,反应条件: 94 ℃预变性30 s,94 ℃变性30 s,68 ℃退火延伸3 min,30个循环。随机挑取14个PCR产物在1.1%的琼脂糖凝胶中150 V电泳20 min进行检测。200个重组子全部进行测序。

(9) 文库的扩增与保存 对原始文库进行扩增与保存,具体操作步骤参照试剂盒CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit的说明书。

2 结果与分析

2.1 总RNA质量鉴定

文库的完整性与mRNA的完整性紧密相关,所以RNA的质量直接影响到整个文库的构建。经1.1%琼脂糖电泳鉴定,可看到清晰的28S、18S和5S条带

(图1),28S条带明显亮于18S条带,比例大约为2:1,表明总RNA的完整性良好。用核酸蛋白检测仪测得 $A_{260}/A_{280} = 1.93$,质量浓度为1 723.4 μg/mL,符合建库要求。

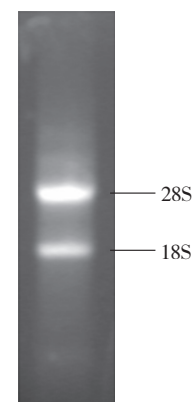


图1 剑尾鱼肝脏总RNA变性琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Analysis of total RNA of *Xiphophorus helleri* liver by denaturing agarose gel electrophoresis

2.2 LD PCR扩增双链cDNA

在MMLV Reverse Transcriptase的作用下,以总RNA为模板,合成cDNA第1条链,然后通过LD PCR成功扩增得到双链cDNA。利用核酸蛋白检测仪测定扩增终产物浓度55 ng/μL,符合实验要求。

2.3 cDNA片段的分离

利用CHROMA SPIN-400柱对cDNA片段进行分级分离,分离过程共获得16管,分别经1.1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,第六管开始出现大于500 bp的cDNA条带(图2)。

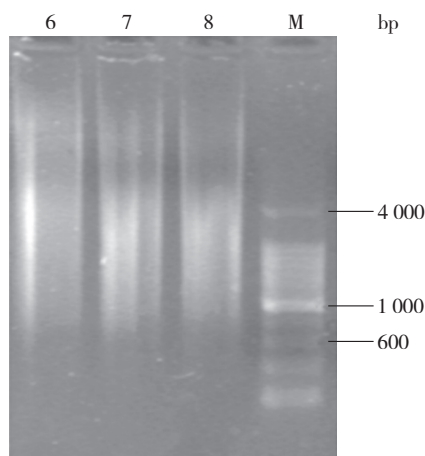


图2 分级分离后的剑尾鱼肝脏 ds cDNA 在 1.1% 琼脂糖凝胶上的电泳结果

M: 200 bp DNA 分子标记; 6-8: 剑鱼肝脏 ds cDNA 样品

Fig. 2 Result of 1.1% agarose gel electrophoresis of the fractions

M: 200 bp DNA Ladder Marker; 6-8: fractionated ds cDNA

2.4 连接效果鉴定

对平板上的重组子进行计数求平均,结果如表 2 所示。以 cDNA (μg)/pDNR-LIB (μg) 为横坐标,平均每微克 cDNA 产生的重组子数为纵坐标作图(图 3),

从图中可以清晰的看到,当 0.30 μg 和 0.45 μg cDNA 与 1 μg pDNR-LIB 质粒进行连接时,平均 1 μg cDNA 产生的重组子数最多,转化效率最高,当 cDNA 的量超过 0.45 μg 时,转化效率逐渐降低。

表 2 不同浓度 cDNA 与 pDNR-LIB 质粒进行连接对转化效率的影响

Tab. 2 Effect of different cDNA concentration on electro-transformation efficiency

项目 Item	编号 Code						
	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
cDNA 浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.18	0.21
pDNR-LIB 浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
重组子(平均) ^①	583	2 160	3 210	3 140	980	520	577
平均 1 μg cDNA 产生的重组子 ($\times 10^3$) ^②	1 554.7	2 880	2 853.3	2 093	522.7	231.1	219.8

Note: ① The quantity of cDNA in ligation reactions. ② The average number of recombinants produced from 1 μg cDNA.

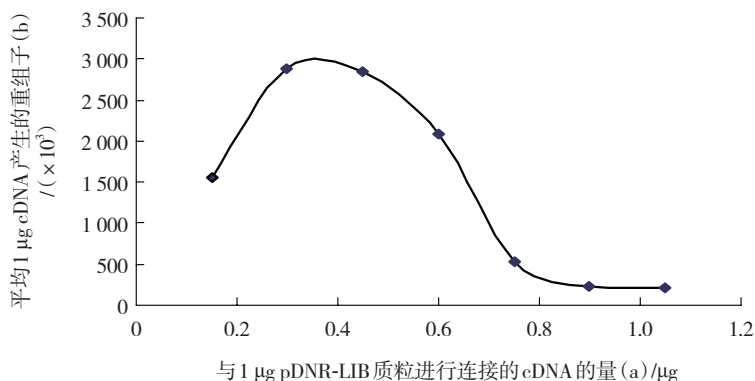


图 3 不同浓度 cDNA 与 pDNR-LIB 质粒进行连接对转化效率的影响

Fig. 3 Effect of different cDNA concentration on electro-transformation efficiency

a-The average amownt of cDNA connected with 1 μg pDNR-LIB; b-The average number of recombinants produced from 1 μg cDNA

2.5 重组子的初步鉴定

从200个单菌落中随机挑取14个进行菌落PCR,在1.1%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图4所示。运用公式:库容量(CFU/mL)=(菌落数×稀释倍数×1 000 mL/L)/涂布菌体体积(μL),计算该文库

约含有 1.2×10^7 个重组子,插入片段介于500~2 500 bp之间。重组效率100%(由于检测时所用模板为菌液,导致图4中部分条带不特异,扩增后的文库滴度为 7.0×10^9 CFU/mL。可见该文库构建成功,且质量较高。

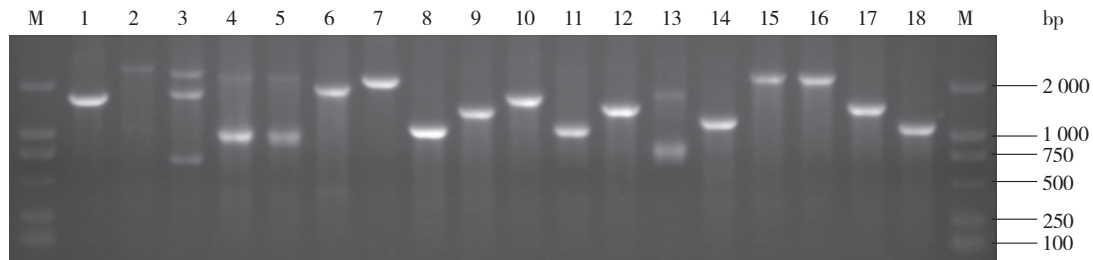


图4 cDNA文库重组子的质粒PCR检测电泳图

M: DL2000 DN标记; 1-18: 随机样品

Fig. 4 Analysis of PCR products of recombinant clones from the original cDNA library by agarose gel electrophoresis

M: DNA Marker DL2000; 1-18: Samples picked at random

2.6 测序结果分析

初步测序共获得200个EST,剪切除去质粒上的共同片段之后,长度大于500 bp的EST有187个,使用Vector NTI程序的Contig Express组件对所测EST序列进行拼接,得到16个重叠群(Contigs),81个单拷贝EST,总计单基因簇97个。单基因簇的最大片段为3 374 bp,最小片段为505 bp。使用GenBank中blast比对,35个单基因簇找到了同源序列,可初步推断其蛋白功能,占总数的36%,还有62个单基因簇是未知序列,占总数的64%。利用AmiGO对已知单基因簇编码的蛋白进行GO分类,其中21个蛋白具有分子功能(Molecular function),占总数的60%;5个蛋白属于细胞组分(Cellular component),约占总数的14.3%;还有5个蛋白的功能与生物学过程(Biological process)相关,约占总数的14.3%;另外4个蛋白功能未知。详细结果见表3。另外,已有部分序列提交GenBank数据库,例如谷胱甘肽S-转移酶(glutathione S-transferase)的登录号为FJ763581、丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂(Serine/cysteine-proteinase inhibitor)的登录号为FJ763582、载脂蛋白A-I(apolipoprotein A-I)的登录号为FJ763583、视黄醇结合蛋白(Retinol-

binding protein)的登录号为FJ763584、弹性蛋白酶4(Elastase 4-like protein)的登录号为FJ763585、纤维蛋白前体(Fibrinogen beta chain precursor)的登录号为FJ763586等等。

3 讨论

3.1 构建文库过程中的注意事项

构建文库的过程比较繁琐,每步操作必须小心,首先,实验过程经常会有DNA或RNA的重悬,在重悬的过程中操作要轻柔,不可太强烈,以免破坏核酸。第二,除了温浴之外,其他步骤尽量在冰上操作。第三,反应体系中最后加酶,并且一定要混合均匀,尽量使酶的效率达到最高。第四,LD PCR扩增cDNA的循环数会直接影响到文库的结果^[9-11],通过实验确定扩增循环数为19,成功扩增得到双链cDNA。试剂盒要求cDNA质量浓度介于40~60 ng/μL,如果质量浓度小于40 ng/μL会使得文库的库容偏小,大于60 ng/μL会降低克隆效率,从而影响文库质量。测定扩增终产物浓度55 ng/μL,符合实验要求。第五,盐浓度直接关系到电转化的效果,乙醇沉淀法虽能降低盐浓度,但同时使微量质粒DNA丢失,不能提高电转化效率,稀释法能更好地提高转化效率^[12-13]。

表3 剑尾鱼肝脏的表达序列标签
Tab.3 ESTs from the liver of *Xiphophorus helleri*

登录号 GenBank access no.	假定蛋白 Putative function	<i>E</i>	近缘种 Relative species	GO分类 Gene ontology	同一性/% Identity	EST 数
AY335905.1	谷胱甘肽S-转移酶 Glutathione S-transferase	6.00E-45	加州鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	Molecular function Catalytic activity	74	1
BT043878	核糖体蛋白质 Ribosomal protein, large P2	6.00E-13	大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	Molecular function	87	1
AY735166.1	补体C3 Complement component C3	8.00E-148	底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>	Molecular function	87	10
EU812516.1	载脂蛋白A-I Apolipoprotein A-I (apoA-I)	5.00E-24	条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	Molecular function	81	3
AB291582.1	泛肽-核糖体蛋白S27a Ribosomal protein S27a	1.00E-152	塞内加尔鲷 <i>Solea senegalensis</i>	Cellular component	91	1
AY550957.1	视黄醇结合蛋白 Retinol-binding protein	1.00E-141	大西洋鲷 <i>Sparus aurata</i>	Molecular function Catalytic activity	82	1
XM_856586.1	胰凝乳蛋白酶原B前驱体 Chymotrypsinogen B precursor	5.00E-47	家犬 <i>Canis familiaris</i>	Biological process Establishment of localization	81	1
AY735181.1	丝氨酸/半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Serine/cysteine-proteinase inhibitor	0	底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>	Molecular function Enzyme-regulator activity	86	2
Y725223.1	Fucolectin	1.00E-116	底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>	Unknown	79	1
DQ141326.1	FBP32II precursor	3.00E-72	条纹石酯 <i>Morone saxatilis</i>	Unknown	75	1
AY735165.1	转铁蛋白 Transferrin	7.00E-60	底鲮 <i>Fundulus heteroclitus</i>	Biological process	79	1
AB020963.1	补体C9 Complement component C9	7.00E-49	牙鲆 <i>Paralichthys olivaceus</i>	Molecular function	79	3
AY298859.1	Rex3反转录转座子 Rex3 retrotransposon	2.00E-35	新月鱼 <i>Xiphophorus maculatus</i>	Cellular component	98	1
XM_695372.3	spen家族 Spen homolog	7.00E-84	斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	Unknown	81	1
DQ388969	温度相关蛋白 Warm temperature acclimation Related B5 protein (Wap65)	4.00E-64	剑尾鱼 <i>Xiphophorus hellerii</i>	Biological process	96	1
EU411249.1	all_halibut.194.C1	0	大西洋庸鲽 <i>Hippoglossus hippoglossus</i>	Unknown	92	1
AY190724.1	40S核糖体蛋白S5 40S ribosomal protein S5	0	真鲷 <i>Pagrus major</i>	Cellular component	93	1
EU325541.1	28S核糖体蛋白 28S ribosomal	4.00E-132	金鲈 <i>Perca flavescens</i>	Cellular component Cytoplasmic part	90	1
EF126038.1	18S核糖体蛋白 18S ribosomal	0	大菱鲆 <i>Scophthalmus maximus</i>	Biological process	96	1
AY550947.1	弹性蛋白酶4 Elastase 4-like protein	0	金头鲷 <i>Sparus aurata</i>	Biological process	83	1
EF014896.2	纤维蛋白前体 Fibrinogen beta chain precursor	6.00E-134	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	Cellular component	79	1

3.2 不同连接反应条件对电转化的影响

cDNA 与 pDNR-LIB 质粒的连接效果直接关系到整个文库构建的好坏,所以选择一个合适的 cDNA 与 pDNR-LIB 质粒的比例很重要,本实验设计了 7 组不同浓度 cDNA 与 1 μg pDNR-LIB 质粒进行连接反应。实验表明,当 cDNA 量小于 0.45 μg 时,转化效率随着 cDNA 浓度的增大而增加,当 cDNA 量大于 0.45 时,转化效率会随着 cDNA 浓度的增大而减小,原因是本实验采用了稀释法降低离子浓度,当 cDNA 浓度小于 0.45 μg 时,离子浓度不足以影响转化效果,用于连接的 cDNA 量越大产生的重组子也就会越多,但是当加入的 cDNA 量大于 0.45 μg (0.75 μL) 时,反应体系里的离子浓度过高,会降低电转化效率,所以虽然 cDNA 的量在增加,但是产生的重组子会不断减少。在本实验中 0.45 μg 和 0.30 μg cDNA 与 0.1 μg pDNR-LIB 进行反应时电转化效率较高,也就是说 cDNA 与 pDNR-LIB 质粒的最佳质量比介于 3 ~ 4.5 之间。

3.3 β -萘黄酮诱导的意义

β -萘黄酮是一种多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 由于人类活动而排放到环境中的 β -萘黄酮越来越多^[14]。Philippe L、Lars F 和 David R 等^[15]实验证明, β -萘黄酮 (β -NF) 对狼鲈 (*Dicentrarchus labrax*)、欧洲黄盖鲈 (*Limanda limanda*) 以及虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的肝脏生物转化功能以及抗氧化酶活性都有诱导作用。Perkins E J、Schlenk D^[16]的实验表明, β -萘黄酮 (β -NF) 对鱼类 CYP1A 有诱导作用。Michael J、Anderson H O 等^[17]研究表明, β -萘黄酮 (β -NF) 对虹鳟肝脏细胞卵黄蛋白原的表达有调节作用。综上所述, β -萘黄酮 (β -NF) 不仅可以诱导多种生物标记物的表达,同时对肝脏的生物转化以及抗氧化酶活性都有诱导作用。本实验先将剑尾鱼暴露在 β -萘黄酮 (100 $\mu\text{g/L}$) 7 d, 然后用于文库构建,有利于筛选新的环境污染相关基因,本实验的初步测序结果中,克隆到了生物标记物谷胱甘肽 S-转移酶 (Glatocnine S-transferase, GST) 基因,同时获得了补体 C3 以及补体 C9 的部分基因序列。

3.4 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)

谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 是一组可以催化谷胱甘肽与多种亲电化合物 (如环氧化合物、卤化有机物、强酸酯) 结合的解毒酶^[18]。在毒物进行生物转化的过程中,形成了一些具有高度反应性的亲电化合物,其中一些可与细胞成分起反应,并引起细胞死亡或诱发肿瘤。在肝、肾等组织中的谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的作用下,谷胱甘肽 (GSH) 可与这些亲电化合物结合,再经一系列转化生成极性的小分子物质从生物体内排出,从而达到解毒的目的^[19]。广泛分布的污染物如 PAHs、PCBs 和二恶英的类似物等通常都是鱼体内谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的诱导剂。剑尾鱼谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 部分基因序列的成功克隆,为剑尾鱼污染物检测提供了新的生物标记物。

3.5 补体系统 (Complement system)

鱼类补体系统大约由 30 余种蛋白裂解酶、酶抑制因子和受体构成的,是机体内最为复杂的限制性蛋白溶解系统^[20]。在鱼类免疫系统进化中,补体的出现比免疫球蛋白还要早,许多研究表明鱼类补体直接参与机体防御,其生物学活性影响机体抵抗微生物的能力、免疫反应细胞间的通讯联系、免疫复合物的形成和持续时间等^[21]。环境雌激素在引起急性中毒和慢性危害的同时,能够影响机体的免疫功能^[22]。机体补体系统中各种蛋白的表达量能否用来检测环境雌激素污染,是一个值得探讨的研究方向,补体 C3 以及补体 C9 的部分基因序列的克隆,为进一步研究补体系统在环境污染物刺激下的作用奠定了基础。

3.6 剑尾鱼肝脏 cDNA 文库

一个成功文库的基本要求是:文库的重组子数量介于 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$,重组率大于 90%,插入 cDNA 片段不小于 300 bp,且平均插入片段不小于 1 kb^[23-24]。按照 cDNA 文库的计算公式,对于低丰度 mRNA 所要求的文库克隆数为 1.7×10^5 个^[25-26]。经测定本实验构建的文库约含有 1.2×10^7 个重组子,重组效率 100%,插入片段介于 500 ~ 2 500 bp 之间,平均插入片段 1.3 kb,扩增后的文库滴度为 7.0×10^9 CFU/mL。可见该文库构建成功,且质量较高。肝脏是鱼类最大的消化

腺,不仅参与脂肪和蛋白质等的代谢、激素的分泌,还是重要的解毒器官,是代谢功能最为活跃的器官,是众多基因表达的重要场所。剑尾鱼肝脏cDNA文库的构建成功,一方面可以永久保存基因资源;另一方面可以利用功能筛选、免疫学筛选、Southern杂交和EST序列测定等现代分子生物学技术寻找肝脏的功能基因。

参考文献:

- [1] 吴淑勤,黄志斌,李凯彬,等.水生实验动物—剑尾鱼[M].北京:中国农业出版社,2005.
- [2] 中华人民共和国农业部公告(第348号),2004,02.
- [3] 刘春,李凯彬,吴淑勤,等.剑尾鱼卵黄蛋白原基因片段克隆、表达及蛋白检测方法的建立[J].中国水产科学,2007,14(6): 883-888.
- [4] 卢玲,沈英娃.酚类、烷基苯类、硝基苯类化合物和环境水样对剑尾鱼和稀有鮡鲫的急性毒性[J].环境科学研究,2002,15(4): 57-59.
- [5] 张勇,张为民,李欣,等.石斑鱼卵巢cDNA文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆[J].中山大学学报:自然科学版,2003,42(2): 66-69.
- [6] 马长艳,周开亚,郭豫杰,等.中华绒螯蟹卵巢差减cDNA文库的构建[J].动物学研究,2003,24(1): 53-56.
- [7] 卢强,丰培金,李莲瑞,等.正常鲤外周血白细胞cDNA文库的构建[J].水产学报,2004,28(5): 585-588.
- [8] 杨芳,贺智敏,詹显全,等.大鲵肝脏组织定向cDNA文库的构建及鉴定[J].动物学报,2004,50(3): 475-478.
- [9] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(6): 2 216-2 220.
- [10] Ohler L D, Rose E A. Optimization of long-distance PCR using a transposon-based model system [J]. PCR Methods Appl, 1992, 2(1): 51-59.
- [11] S Cheng, C Fockler, W M Barnes, et al. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(12): 5 695-5 699.
- [12] M Jacobs, S Wnendt, U Stahl. High-efficiency electro-transformation of *Escherichia coli* with DNA from ligation mixtures [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(6): 1 653.
- [13] Tracy A W, Nicholas M G, High V. *E. coli* eletrotransformation with DNA following ligation [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16(24): 11 820.
- [14] 联合国海洋环境保护科学问题联合专家组(GESAMP). Impact of oil and chemical wastes on the marine environment [R]. London: IMO Press, 1993. 50: 180.
- [15] Philippe L, Lars F, David R. Responses of hepatic biotransformation and antioxidant enzymes to CYP1A-inducers (3-methylcholanthrene, β -naphthoflavone) in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), dab (*Limanda limanda*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquatic Toxicology, 1996, 36: 141-160.
- [16] Perkins E J, Schlenk D. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 1998, 121: 305-310.
- [17] Michael J, Anderson H O. In Vivo Modulation of 17β -Estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by β -Naphthoflavone [J]. Society of Toxicology, 1996, 137: 210-218.
- [18] 张毓琪,陈叙龙.环境生物毒理学[M].天津:天津大学出版社,1993: 35-37.
- [19] 宋文婷,陆光华.指示水生生态系统环境雌激素暴露的多种生物标志物的选择[J].生态环境,2008,17(1): 434-438.
- [20] Timothy R. Evolution of the complement system [J]. Immunol Today, 1991, 12: 295-312.
- [21] Claire M H, Lambris J D. The complement system in teleosts [J]. Fish Shellf Immunol, 2002, 12: 399-420.
- [22] Sattar A A, The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field [J]. Toxicology, 2000, 150: 191-206.
- [23] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA文库构建策略及其分析研究进展[J]. 云南农学报, 2002, 21(1): 1-6.
- [24] 赵亚华. 分子生物学教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [25] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南: 第3版[M]. 黄培堂译, 北京: 科学出版社, 2002: 857-916.
- [26] 吴乃虎. 基因工程原理(上)[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 322-335.

Construction of cDNA library from liver of *Xiphophorus helleri*

LIU Po^{1,2}, LI Kai-bin², WANG Fang², LIU Cun², NIE Xiang-ping³, WU Shu-qin²

(1. Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China; 3. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The Swordtail fish, *Xiphophorus helleri*, which is originated from Mexico and Guatemala, was artificially cultured by Pearl River Fisheries Research Institute as early as in 1987. Up to the present, the Swordtail fish is applied to the study of water-environment detecting, aquacultural drugs safety assessment, animal disease model and so on. A cDNA library for the liver of *Xiphophorus helleri* exposed to beta-Naphthoflavone was successfully constructed by SMARTTM (Switching Mechanism At 5' end of RNA Transcript) using CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit. Single-strand cDNA was synthesized with the template of total RNA which has been extracted from the liver of *Xiphophorus helleri* using SV Total RNA Isolation System by MMLV Reverse Transcriptase, and double-strand cDNA was synthesized and amplified by long-distance PCR. The PCR products, which were Sfil-digested and size fractionated by CHROMA SPIN-400TM, were ligated to the pDNR-LIB vector which was Sfil-digested and dephosphorylated. The ligation mixture was transformed into *E.coli* DH5 α by electroporation. The cDNA library contained 4.2×10^7 independent clones with DNA inserts of 0.6 kb–2.5 kb. The recombination rate was 100%. One hundred and eighty seven ESTs were obtained by gene sequencing of 200 recombinants which were picked up randomly. In addition, 97 non-repetitive sequences were formed including 16 contigs and 81 singletons from these ESTs after initial assembly. The result proves that the quality of this cDNA library is very good. This cDNA library provides a valuable resource for the functional genome research of the *Xiphophorus helleri*, and it will form a fundamental base for further screen and clone of the environmentally-related genes. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (4): 487–495]

Key words: *Xiphophorus helleri*; liver; cDNA library

Corresponding author: WU Shu-qin. E-mail: wushuqin001@21cn.com