

三丁基锡暴露条件下杂色鲍肝胰腺均一化 cDNA 文库的构建

贾锡伟^{1,2} 张子平³ 邹志华² 王艺磊²

¹厦门大学 近海海洋环境科学国家重点实验室 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005;

²集美大学水产学院 福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室, 厦门 361021;

³德克萨斯州立大学化学与生物化学系, 美国圣马科斯, TX 78666)

摘要: 用 RDP 试剂提取三丁基锡暴露诱导的杂色鲍肝胰腺总 RNA, 经 Oligotex 纯化得到 mRNA; 应用 SMART 技术合成双链 cDNA, 双链特异核酸酶 (DSN) 进行双链 cDNA 的均一化, 构建了杂色鲍三丁基锡暴露诱导下的均一化 cDNA 文库。原始文库的库容为 4.3×10^6 CFU/ml, 重组率为 97.9%。从文库中随机挑选了 3 288 个克隆进行测序, 得到 3 048 个高质量 EST 序列, 其中有 370 条 Contigs, 2 103 条 Singlets, Unigenes 共 2 473 条, 冗余率为 18.86%。以上结果说明该文库质量较好, 为进一步筛选相关功能基因打下基础; 较低的冗余率说明该文库值得继续使用大规模 ESTs 测序的方法寻找相关功能基因, 并为进一步使用基因芯片技术研究相关功能基因的表达谱提供便利。

关键词: 三丁基锡 杂色鲍 均一化 cDNA 文库

Construction of Normalized cDNA Library from Hepatopancreas of Abalone *Haliotis diversicolor supertexta* Exposure to Tributyltin

Jia Xiwei^{1,2} Zhang Ziping³ Zou Zhihua² Wang Yilei²

¹State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005; ²The Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety,

Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021; ³Department of Chemistry and Biochemistry, Texas State University, San Marcos, TX 78666 USA)

Abstract: A normalized cDNA library from hepatopancreas of abalone *Haliotis diversicolor supertexta* exposure to Tributyltin was constructed. Total RNA were prepared using RDP reagent. Oligotex (QIAGEN) was used to separate the mRNA from total RNA. The first strand cDNA was synthesized by transcription of mRNA with the SMART technique. The LD-PCR was performed using a modified SMART primer as the primer set, and the first -strand cDNA as the template to synthesize double strand cDNA. Double strand cDNA was normalized using Duplex-Specific Nuclease (DSN). The containing capacity of the unamplified cDNA library was 4.3×10^6 CFU/ml with a recombinant rate of 97.9%. A total of 3 288 clones were random selected to be sequenced, and 3 048 high quality ESTs were generated. After processing, a total of 2 473 unigenes comprising 370 contigs and 2 103 singlets were obtained. The redundancy was 18.86%. These results indicate that the normalized cDNA library is suitable to be used for further cloning and analysis of genes related to tributyltin exposure.

Key words: Tributyltin (TBT) *Haliotis diversicolor supertexta* Normalized cDNA library

20世纪 60年代以来, 由于三丁基锡可以有效防止污损生物附着而广泛应用于船舶、码头及网箱

收稿日期: 2009-07-21

基金项目: 厦门市科技计划项目 (3502Z20055024), 国家自然科学基金 (20877034), 集美大学创新团队基金 (2008A001)

作者简介: 贾锡伟 (1977-), 助理研究员, 主要从事水产动物功能基因组学研究

通讯作者: 王艺磊, E-mail: ylwang@jmu.edu.cn

的油漆涂料中。三丁基锡在低浓度下就可以对目标生物和非目标生物产生毒害作用,如性逆转及不育^[1-5],内分泌干扰^[6],免疫毒性^[7-10],细胞凋亡诱导^[11-13]等。虽然世界海事组织于2003年通过法令,禁止三丁基锡在部分小型船舶上使用^[14],但是很多发展中国家,包括我国对三丁基锡的使用并没有明确的禁令。在我国,无论是在水体环境,底泥以及海产品中都可以检测到三丁基锡的存在^[15-17]。

杂色鲍(*Haliotis diversicolor supertexta*)是我国南方沿海重要的经济养殖贝类,目前国内对杂色鲍的研究主要集中在种质资源^[18-21]及病害^[22-24]等方面,而对杂色鲍的毒理学^[25,26]及相关功能基因的研究较少。为此,本试验构建了三丁基锡诱导的杂色鲍肝胰腺均一化 cDNA文库,该文库对进一步筛选杂色鲍污染物暴露诱导相关功能基因提供了有力工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验对象 杂色鲍购自福建省东山岛,壳长 4.65 ± 0.27 cm,体重 10.07 ± 2.03 g。在集美大学海水养殖场暂养2周,每天更换新鲜砂虑海水并喂食石莼和江蓠,鲍密度为1只/3 L海水,海水温度为23~25。

1.1.2 化学试剂 RNA抽提试剂RDP由本实验室自制^[27];oligotex试剂盒购自QIAGEN公司;CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction Kit购自Clontech公司;TRMMER-DIRECT cDNA Normalization Kit购自Innovative公司;氯化三丁基锡购自Sigma公司,用100%乙醇配制成 3.5 g (Sn) /L的母液待用。

1.1.3 引物 引物名称及序列见表1。

表1 引物序列

引物名称	序列(5' - 3')
SMART	AAGCA GTGGTA TCAACGCA GTGGCCAT-TACGGCCGGG
CDS 3M	AAGCA GTGTA TCACGCGA GTGCCA GGCG-GCCT(17)
5PCR primer	AAGCA GTGGTA TCAACGCA G
PCR primerM1	AAGCA GTGGTA TCAACG
PCR primerM2	AAGCA GTGGTA TCAACGCA G
M13F	GTA AACACGACGGCCAG
M13R	CAGGAAACAGCTATGACC

1.2 方法

1.2.1 三丁基锡暴露试验 在前期试验中,经测定,三丁基锡对杂色鲍96 h半致死浓度为 3.5 μ g (Sn) /L^[28]。暴露试验采用杂色鲍96 h半致死浓度的1/10,即 0.35 μ g (Sn) /L,每天更换新鲜海水和三丁基锡,并喂食石莼和江蓠。分别于暴露试验2,6,24,48,96,192 h后采集杂色鲍肝胰腺置于液氮中速冻,并于-80 °C冰箱中保存备用;每个时相取15只。

1.2.2 总RNA提取及mRNA分离 每只鲍取50~100 mg肝胰腺组织于1 ml RDP试剂中充分匀浆,静置10 min;12 000 g离心10 min,取上清,加入200 μ l 氯仿,充分混匀,静置10 min;12 000 g离心15 min,取上清,加入500 μ l 异丙醇进行沉淀,充分混匀,静置15 min;12 000 g离心10 min,弃上清,1 ml 75%乙醇清洗RNA沉淀,7 500 g离心5 min,重复清洗一次;最后于1 ml 100%乙醇中-80 °C保存。取等量各时相总RNA混合,用oligotex试剂盒分离mRNA。

1.2.3 双链cDNA的合成 取 0.5 μ g mRNA,分别加入1 μ l SMART引物(10 μ M)和CDS III引物(10 μ M),加水至总体积5 μ l,72 °C变性2 min,冰浴2 min;在Superscript逆转录酶作用下,42 °C 2 h,合成cDNA第一链。取cDNA第一链2 μ l,加入80 μ l 去离子水,10 μ l 10 \times Advantage 2 PCR Buffer, 2 μ l 50 \times dNTP Mix, 4 μ l 5 PCR Primer, 2 μ l 50 \times Advantage 2 Polymerase Mix,用长距离PCR的方法合成cDNA第二条链。

1.2.4 cDNA均一化 取4 μ l 纯化后的cDNA加入4 μ l 杂交缓冲液,加水至16 μ l,98 °C变性2 min,68 °C杂交5 h,加入适量DSN酶及缓冲液处理20 min,加入10 μ l 终止缓冲液完成cDNA均一化。

1.2.5 均一化文库构建 分别以PCR primer M1和PCR primer M2为引物,对均一化后的cDNA进行两轮PCR扩增;取1 μ g 纯化过的cDNA用Sfi I核酸内切酶酶切2 h后割胶纯化大于500 bp的cDNA片段;回收的片段与经过Sfi I核酸内切酶处理过pDNR-LB文库载体连接过夜;连接产物直接转化大肠杆菌感受态细胞,制成原始文库。

1.2.6 文库库容测定及质量鉴定 取适量原始文库进行 10^{-3} , 10^{-6} 梯度稀释, 每个梯度设 3 个平行, 取适量稀释液于 90 mm 培养皿中涂布, 37 °C 培养过夜, 计数培养皿中克隆数目以计算出文库库容; 随机挑选 96 个单克隆, 以 M13 通用引物 PCR 扩增, 电泳检测插入片段大小及计算文库重组率。

1.2.7 测序 随机挑选 3 288 个克隆送华大基因进行测序。

2 结果

2.1 总 RNA 提取及 mRNA 分离

用 RDP 试剂提取的总 RNA 经 1% 琼脂糖电泳检测 (图 1), 18S rRNA 和 28S rRNA 两条带清晰, 说明总 RNA 没有降解, 质量较好; 经 Oligotex 试剂盒对 mRNA 分离纯化后 (图 2), mRNA 在较大范围内弥散分布, 28S 和 18S rRNA 已基本被去除, mRNA 大小适于构建文库。

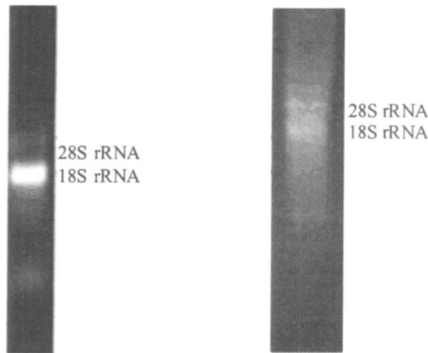


图 1 杂色鲍肝胰腺总 RNA

图 2 杂色鲍肝胰腺 mRNA

2.2 双链 cDNA 的合成

cDNA 第一链经过 18 个循环扩增合成双链, 取适量 PCR 产物电泳检测, 结果显示双链 cDNA 片段主要分布在 0.2 ~ 4 kb 左右 (图 3), 并有一些清晰的特异性条带, 应为高丰度基因。

2.3 cDNA 均一化

DSN 酶切后的均一化 cDNA 经过两轮抑制性 PCR 扩增后, 取适量 PCR 产物电泳检测, 与均一化前相比, 条带弥散分布更加均匀, 无特异条带出现 (图 4)。

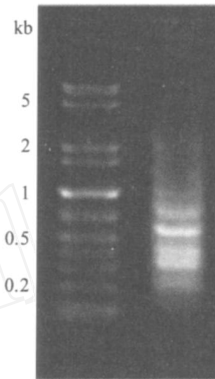


图 3 杂色鲍肝胰腺未均一化双链 cDNA

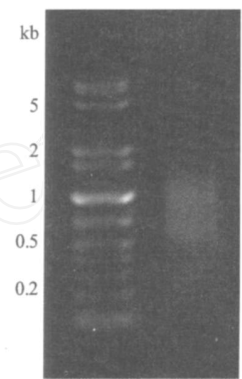


图 4 杂色鲍肝胰腺均一化双链 cDNA

2.4 文库库容及质量

经测定, 文库库容未 4.3×10^6 CFU/ml; 随机挑选 48 个克隆, 以载体特异的 M13 正向引物和 M13 反向引物进行 PCR 扩增, 插入片段大小为 0.5 ~ 2 kb (图 5), 说明该文库质量较好, 重组率为 97.9%。

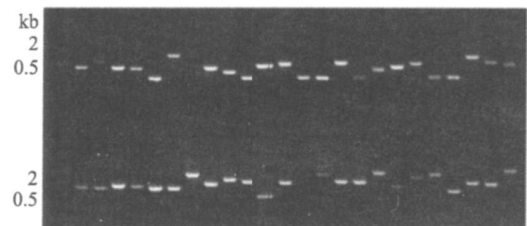


图 5 48 个随机克隆 PCR 检测文库质量

2.5 测序

从文库中随机挑选了 3 288 个克隆进行测序, 得到 3 048 个高质量 EST 序列, 其中有 370 条 Contigs, 2 103 条 Singlets, Unigenes 共 2 473 条, 冗余率只有 18.86%。

3 讨论

近年来, 应用 SMART (switching mechanism at 5 end of RNA transcript) 技术构建全长 cDNA 文库, 从而筛选和克隆相关功能基因的报道越来越多, 在水产动物中, 应用 SMART 技术已经成功构建了多个物种的全长 cDNA 文库^[29~32]。利用该技术可以有效避免经典 cDNA 文库构建时的一些技术缺陷, 如反转录效率低, 不能有效合成全长 cDNA 第一链; cDNA 全长克隆一般表达较弱, 需多轮筛选才可能得到全长其序列等^[33]。本研究所得到的 cDNA

片段主要分布在 500 bp ~ 3 kb,随机测序结果发现大多数克隆可以找到 polyA 尾,表明文库构建很成功,为进一步筛选相关功能基因提供了便利。

在真核生物中,基因转录水平可以分为高、中、低 3 种,基因拷贝数可以从几万到几个乃至单拷贝不等,一般来说,每个细胞中约表达 10 ~ 20 个高丰度基因(每个基因数千拷贝),数百个中等丰度基因(每个基因数百拷贝),几千个稀有基因(每个基因单拷贝到几十拷贝)^[34]。由此可知,从普通 cDNA 文库中直接测序寻找稀有基因非常低效,因为高丰度和中等丰度表达基因将被大量重复测序。均一化 cDNA 文库的构建可以有效避免上述问题,通过均一化可以有效减少高中丰度表达基因的拷贝数,降低文库冗余率,极大的提高了通过随机测序方法得到稀有基因的概率。

目前均一化 cDNA 文库的构建主要依据以下两种原理:一种是基于基因组 DNA 在拷贝数上具有相对均一化的性质,通过 cDNA 与基因组 DNA 饱和杂交而降低在文库中高拷贝存在的 cDNA 的丰度;另一种是基于复性动力学的原理,高丰度的 cDNA 在退火条件下复性的速度快,而低丰度的 cDNA 复性要较长时间,从而可以通过控制复性时间来降低丰度。第一种方法易于掌握,其缺点是采用基因组 DNA 饱和杂交的方法会因为低拷贝的表达基因拷贝数少而无法被杂交上^[35];而后一种方法的掌握对技术的要求比较高,对多数人而言需要多次摸索才能找到最适条件。

本研究基于 cDNA 复性动力学原理,进一步采用双链特异核酸酶(duplex-specific nuclease, DSN)酶切技术^[36],特异降解在复性过程中的双链 cDNA,达到均一化目的。该方法更适用于片段较长 cDNA 的均一化,其均一化是在 cDNA 克隆之前进行,而且不用物理分离单链 DNA 和双链 DNA 片段,因此操作简便;另外,DSN 酶在 55 ~ 65 都有非常好的酶切活力,因此双链 cDNA 的酶切可以在较高温度下进行,从而有效降低了由于二级结构的形成和非特异性杂交引起的转录本缺失。所构建的杂色鲍肝胰腺均一化 cDNA 文库的冗余率仅为 18.86%,大大低于普通 cDNA 文库^[37,38];与另一种常用的富集稀有基因的方法差减 cDNA 文库构建相比,冗余率也相对较低^[39~42]。本实验室应用同样方法所构建的两

个均一化 cDNA 文库同样有较低的冗余率^[43,44]。总之,本研究所构建的均一化 cDNA 文库的库容(4.3×10^6 CFU/ml)和重组率(97.9%)都完全符合文库构建的要求,较低的冗余率说明该文库值得继续使用大规模 ESTs 测序的方法寻找相关功能基因,并为进一步使用基因芯片技术研究相关功能基因的表达谱提供便利。

参考文献

- 1 施华宏,黄长江,谢文勇. 海洋环境科学, 2002, 21: 37 ~ 41.
- 2 Horiguchi T, Takiguchi N, Cho HS, et al Marine Environmental Research, 2000, 50: 223 ~ 229.
- 3 Horiguchi T, Kojima M, Kaya M, et al Marine Environmental Research, 2002, 54: 679 ~ 684.
- 4 Horiguchi T, Kojima M, Takiguchi N, et al Marine Pollution Bulletin, 2005, 51: 817 ~ 822.
- 5 Rundur SI. Marine Pollution Bulletin, 2000, 40: 893 ~ 897.
- 6 Siah A, Pellerin J, Amiard JC, et al Comparative Biochemistry and Physiology (Part C), 2003, 135: 145 ~ 156.
- 7 Beckmann N, Morse PP, Moore CM. Journal of Invertebrate Pathology, 1992, 59: 124 ~ 132.
- 8 Cajaville MP, Olabarrieta I, Marigomez I. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1996, 35: 253 ~ 260.
- 9 Cima F, Ballarin L, Bressa G, et al Applied Organometallic Chemistry, 1995, 9: 567 ~ 572.
- 10 Cima F, et al Chemosphere, 1998, 37: 3035 ~ 3045.
- 11 Cima F, et al Marine Pollution Bulletin, 1999, 39: 112 ~ 115.
- 12 Jha AN, et al Environmental and Molecular Mutagenesis, 2000, 35 (4): 343 ~ 50.
- 13 Hagger JA, et al Aquatic Toxicology, 2002, 57: 243 ~ 255.
- 14 Bekri K, et al Chimica Acta, 2006, 578: 203 ~ 212.
- 15 李中阳,等. 中国环境科学, 2003, 23 (2): 144 ~ 147.
- 16 Jiang CB, et al Environmental Pollution, 2001, 115: 81 ~ 87.
- 17 Wang XH, Hong HS, Zhao DM, et al Environmental Behavior of Organotin Compounds in the Coastal Environment of Xiamen, China Marine Pollution Bulletin 5th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology, 2008, 57: 419 ~ 424.
- 18 苏天凤. 南方水产, 2006, 2: 64 ~ 67.
- 19 王鹭骁,王志勇,柯才焕,等. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44: 98 ~ 101.
- 20 黎中宝,田柱,朱冬蕊,等. 海洋科学, 2004, 28: 27 ~ 31.
- 21 黎中宝. 中国生态农业学报, 2004, 12: 60 ~ 63.
- 22 张朝霞,等. 厦门大学学报(自然科学版), 2003, 42: 363 ~ 368.

(下转第 144 页)

现两者的同源性为 87%,推测这二者编码的蛋白酶可能是一对同工酶。对获得 EFP cDNA 序列分析,认为该序列是一个完整的成熟肽编码框,其中 1~672 位核苷酸为成熟肽编码序列,673~675 位 TAA 是终止密码子,共编码 224 个氨基酸残基。

该地鳖虫纤溶活性蛋白成熟肽编码序列首先在大肠杆菌表达系统中进行重组表达,结果目的蛋白大部分以包涵体形式存在,且复性后无纤溶活性(结果未列出),可能与其未正确糖基化有关,遂选择毕赤酵母表达系统进行重组表达。毕赤酵母是近年来广泛应用的真核表达系统,具有表达效率高、遗传稳定性好、糖基化适中、表达产物可分泌等多种优点。已有多数具有纤溶活性的蛋白在该宿主系统中进行成功表达^[6,7]。

地鳖虫纤溶活性蛋白成熟肽编码序列在毕赤酵母 GS115 成功表达,且有较高的纤溶活性。作为一种真核生物,毕赤酵母可以进行一系列的翻译后的修饰,如二硫键的形成、蛋白前体的加工,以及糖基化等^[8]。对 EFP 进行糖基化位点在线分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services>),发现该蛋白含有 6 个 O-

糖基化位点,经 SDS-PAGE 电泳分析,EFP 的分子量约为 28.2 kD,EFP 基因所对应的分子量约为 24.6 kD,用大肠杆菌表达的 EFP 蛋白除去融合蛋白部分,分子量也约为 24 kD(结果未列出),由于用酵母表达的 EFP 能够在糖基化位点上进行正确糖基化,所以使表达的蛋白其分子量要比理论上的分子量大,这可能也是用大肠杆菌表达重组 EFP 无活性而用毕赤酵母表达有活性的原因。

参考文献

- 1 李卫星,王中枢.生物化学与生物物理学报,1989,21(4):299~306
- 2 韩雅莉,李张伟.生物工程学报,2006,22(3):230~235.
- 3 Astup T,Mullertz S *Archs Biochem Biophys*,1952,40:346~351.
- 4 Weon-Kyoo You, Young-Doug Sohn, Ki-Yong Kim, et al *Insect Biochemistry and Molecular Biology*,2004,34:239~250.
- 5 Nobuyoshi N,Manabu S, Kohji I *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*,2003,23:191~212
- 6 Ge T, Sun ZJ, Fu SH, Liang GD. *Protein Expression and Purification*,2005,42:20~28.
- 7 Pratap J, Rajamohan G, Dikshit KL. *Appl Microbiol Biotechnol*,2000,53(4):469~475.
- 8 Cereghino JL, Cregg JM. *FEMSMicrobiol Rev*,2000,24:45~66.

(上接第 139 页)

- 23 王广军,谢骏,余德光.上海水产大学学报,2005,14:238~241.
- 24 王志,蔡俊鹏,徐丽,等.微生物学报,2005,45:634~637.
- 25 郁昂,等.厦门大学学报(自然科学版),2004,43(4):563~567.
- 26 谢仁政,符世伟.水产养殖,2007,28:9~12.
- 27 Chmczynski P, Sacchi N. *Analytical Biochemistry*,1987,162:156~159.
- 28 Jia XW, et al *Chin J Oceanol Limnol*,2009,27:1~9.
- 29 王艺磊,张子平,戴军,等.中国水产科学,2004,11:190~195.
- 30 刘晓,高其康,张国范.水产学报,2004,28:23~28.
- 31 贾锡伟,王艺磊,张子平,等.厦门大学学报(自然科学版),2004,43:547~550.
- 32 刘晓,赵敏,高其康,等.海洋与湖沼,2006,37:355~360.
- 33 Caminci P, Kvan C, Kitamura A, et al *Genomics*,1996,37:327~336.
- 34 Galau GA, et al *Arch Biochem Biophys*,1977,179:584~599.
- 35 晏慧君,黄兴奇,程在全.云南农业大学学报,2006,21:1~6.
- 36 Shagin DA, et al *Genome Res*,2002,12:1935~1942.
- 37 刘萍,邱高峰,郑亮,等.上海水产大学学报,2008,17:129~133.
- 38 王博,艾秀莲,王志方,等.新疆农业科学,2008,45:56~60.
- 39 Park Jong-Sug, et al *Plant Science*,2004,166:953~961.
- 40 Zhang JP, Liu TS, Fu JJ, et al *Genomics*,2007,90:121~131.
- 41 Margaret BM, et al *Mar Environ Res*,2008,66:127~130.
- 42 Pallavicini Alberto, Del Mar Costa, Gestal Camino, et al *Developmental & Comparative Immunology*,2008,32:213~226.
- 43 邹志华,张子平,王艺磊,等.福建水产,2007,4:1~4.
- 44 王淑红,邹志华,张子平,等.台湾海峡,2008,27:278~285.