

文章编号: 1004 - 7271(2008)02 - 0129 - 05

罗氏沼虾促雄腺 cDNA 文库的构建及 部分表达序列标签的筛选

刘 萍, 邱高峰, 郑 亮, 张玉珂

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘 要:促雄腺是甲壳动物雄体特有的内分泌腺,在性别分化中起关键作用。为了获得罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 促雄腺的表达序列标签 (ESTs) 及可能的功能基因全序列,运用 SMART 技术构建罗氏沼虾促雄腺 cDNA 文库,用菌落 PCR 的方法对 cDNA 文库进行初步筛选,在筛选的 114 个阳性重组克隆中随机挑取 24 个克隆测序,有 12 条 EST 序列,其中 4 个 cDNA 功能基因,4 个 rRNA,4 个新基因。该研究用 SMART 技术获得全长 cDNA 序列的比率较高,同时对分离的四个已知基因的潜在功能进行了初步推断,为进一步筛选与罗氏沼虾促雄腺分化和发育调控相关的功能基因奠定了基础。

关键词:促雄腺; 罗氏沼虾; 表达序列标签; cDNA 文库

中图分类号: S 917 文献标识码: A

The construction of androgenic gland cDNA library of malaysian giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the partial screening of expressed sequence tags

LIU Ping, QIU Gao-feng, ZHENG Liang, ZHANG Yu-ke

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated by Ministry of Agriculture,
Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: The androgenic gland is an endocrine gland that exists only in male Crustacea. It has been shown that the androgenic gland plays a critical role in sex differentiation. In order to obtain expressed sequence tags (ESTs) and possible full-length sequences of functional genes in the androgenic gland of Malaysian giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*, a cDNA library of the androgenic gland was constructed by using the SMART technology. Partial screening was performed through the cDNA library by means of the colony PCR. Of 114 positive recombinants, 24 clones were randomly picked up to sequence. The results revealed a total of 12 ESTs including 4 functional genes, 4 rRNAs and 4 new genes with no homologies in the Genbank. The present research has a high ratio of full-length cDNA sequences using the technology of SMART and makes a primary conclusion for the potential functions of the four isolated known genes. Thus, it establishes the platform for further screening more functional genes related to the differentiation and development of the androgenic gland.

收稿日期: 2007-04-30

基金项目: 上海市教委重点学科资助项目 (Y1101)

作者简介: 刘 萍 (1983 -), 女, 上海市人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物遗传与繁殖。

通讯作者: 邱高峰, Tel: 65710705, E-mail: gfqiu@shfu.edu.cn

Key words: androgenic gland; *Macrobrachium rosenbergii*; expressed sequence tags, ESTs; cDNA library

表达序列标签(ESTs)是指从构建的cDNA文库中随机挑选克隆,进行5'或3'端测序后得到的部分cDNA序列,一个EST对应于某一种mRNA的cDNA克隆的一段序列,长度一般为300~500 bp^[1]。相对于全基因组测序,EST是发现基因最有效率的方法。从编码蛋白质的mRNA出发,构建cDNA文库,并对文库进行筛选测序,将得到的EST与GenBank等数据库中的数据进行核酸或蛋白质序列的同源性比较,可以鉴定出已知基因和新基因。

随着EST测序的飞速发展,到2004年,美国国家生物技术信息中心的EST数据库中已录入的来自不同物种的不同组织的EST共有17 291 123条^[2]。近年来,在甲壳动物的各组织中也陆续展开cDNA文库的构建及ESTs的部分测序工作,包括对虾的血液、眼柄、卵巢、头胸部^[3]、鳃^[4]和性腺^[5]以及蟹的性腺^[6]。但甲壳类促雄腺cDNA文库的构建及ESTs的研究尚未见报道。

促雄腺又名造雄腺、雄性腺,于1954年首次在跳钩虾中被发现^[7],是甲壳动物雄体内特有的内分泌器官,呈索状附着于射精管表面^[8],以全泌方式分泌雄性腺激素,其分泌的激素能诱导甲壳动物性别分化、促进精子发生及第二性征的形成^[9]。本研究运用SMART技术构建罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)促雄腺cDNA文库,旨在从罗氏沼虾促雄腺cDNA文库中获得ESTs及可能的功能基因全序列,从而为研究促雄腺激素及其相关基因奠定基础。

1 材料与方法

1.1 总RNA的提取和mRNA的纯化

罗氏沼虾购自上海图们路农贸市场,挑选个体大的雄体20只,活体解剖取出输精管,在解剖镜下剥离促雄腺,迅速放入液氮。采用Trizol试剂(Invitrogen)提取罗氏沼虾促雄腺的总RNA,依照说明书用Mini mRNA Purification Kit (Omega)纯化mRNA。

1.2 cDNA的合成

取50ng罗氏沼虾促雄腺的mRNA,按照Clontech公司的Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit合成SMART第一链cDNA。之后取2 μL第一链cDNA,同样按照说明书配成100 μL反应液,反应条件为95℃20 s,然后95℃5 s,68℃6 min,20个循环,合成双链cDNA。

1.3 蛋白酶K的消化、Sfi I的酶切与cDNA片段的分离

取50 μL双链cDNA,加2 μL蛋白酶K(20 μg/μL),45℃20 min,加50 μL无菌双蒸水。加100 μL苯酚/氯仿/异戊醇,离心取上清。收集的上清液中再一次加100 μL苯酚/氯仿/异戊醇,离心取上清。加10 μL 3M醋酸钠,1.3 μL糖原(20 mg/mL)和260 μL 95%酒精。离心,移去上清,75%酒精清洗,风干后溶解于79 μL的无菌双蒸水。

将79 μL cDNA、10 μL 10×Sfi I缓冲液、10 μL Sfi I酶和1 μL 100×BSA配成100 μL反应液。50℃2 h。酶切产物的分离在CHROMA SPIN-400柱中进行。

1.4 cDNA与载体的连接和转化

取1 μL cDNA、1 μL pDNR-LIB (0.1 mg/mL)、0.5 μL 10×Ligation缓冲液、0.5 μL ATP (10 mM)、0.5 μL T4 DNA连接酶和1.5 μL去离子水,配成5 μL反应液,16℃12~16 h。加15 μL无菌双蒸水。将连接液转化至E. coli感受态细胞。

1.5 cDNA文库的筛选与测序

用菌落PCR方法筛选cDNA克隆。引物为M13F(5'-GTAAAACGACGGCCAG-3')和M13R(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')。PCR反应体系参考北京天根生物科技有限公司Taq说明书。反应条件为95℃6 min;94℃30 s,55℃30 s,72℃2 min,30个循环。

随机挑选 24 个阳性克隆,送申能博彩生物科技有限公司测序。其中插入片段分子量大于 500 bp 的克隆采用 M13F 与 M13R 双向测序,其余用 M13F 单向测序。测序得到的数据用 dnatoools 6 软件分析,去掉载体,找出最大开放阅读框并翻译成氨基酸,用 BLAST 进行氨基酸序列搜索。

2 结果

2.1 总 RNA 的抽提及 mRNA 的纯化

用 Trizol 提取总 RNA,结果清晰可见 18S rRNA 和 28S rRNA,说明总 RNA 未出现降解,可用于 mRNA 的提纯(图 1)。用 Mini mRNA Purification Kit (Omega) 纯化 mRNA,结果显示 18S rRNA 与 28S rRNA 已被去除,一片拖尾即 mRNA 的范围在大约 0.3 ~ 2 kb 之间,符合构建 cDNA 文库的要求(图 2)。

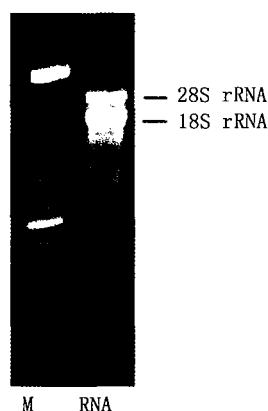


图 1 罗氏沼虾促雄腺总 RNA

Fig. 1 Total RNA of prawn androgenic gland

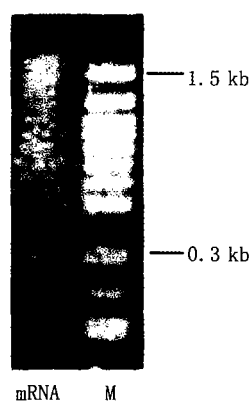


图 2 罗氏沼虾促雄腺 mRNA

Fig. 2 mRNA of prawn androgenic gland

2.2 cDNA 的合成

采用 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA。用 50 ng 的 mRNA 合成第一链 cDNA,通过 LD PCR 的方法合成双链 cDNA,PCR 产物在 0.1 ~ 4 kb 之间,呈现一片带状,分子量大小与说明书中建库的要求相符(图 3)。

2.3 cDNA 的分级分离与转化

经过 Sfi I 酶切处理的 cDNA 通过 CHROMA SPIN-400 柱进行分级分离,收集分流的 cDNA 片段,共 16 管,电泳检测显示从 7 管开始流出 cDNA 片段,故根据说明书利用前 4 管收集液的原则,混合第 7-10 管收集液,用于随后的连接反应,必须指出的是本研究 cDNA 片段流出时间比说明书描述的从第 4 管开始流出时间延迟了 3 管。

与 pDNR-LIB 载体连接后,重组子转化感受态细胞,涂板。未扩增文库的滴度约为 1.0×10^5 pfu/mL。

2.4 cDNA 文库筛选

用 M13F 和 M13R 引物进行菌落 PCR 鉴定,共筛选了 400 多个克隆,由于空质粒的扩增长度为 500 bp,由此判断分子量大于 500 bp 的片段为阳性重组克隆,共筛选出 114 个重组阳性克隆,阳性比例

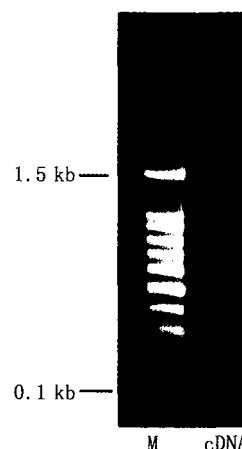


图 3 罗氏沼虾促雄腺双链 cDNA

Fig. 3 Double strand cDNA of prawn androgenic gland

为 28.5%, 可以送测序。图 4 为其中一张菌落 PCR 的电泳图谱。根据分子量大小可得知, 3-7、9-13 号是阳性重组克隆, 8、14 和 15 号克隆分子量为 500 bp, 为质粒。



图 4 菌落 PCR 的电泳图谱

Fig. 4 Analysis of colony PCR by agarose gel electrophoresis

2.5 部分 ESTs 克隆的测序及结果

根据 cDNA 文库筛选结果, 随机挑选 24 个阳性克隆由申能博彩生物科技有限公司测序。将测序结果翻译成氨基酸序列, 序列分析结果表明, 在所测的 24 个序列中, 有 12 个序列未发现开放阅读框, 用 Blast 在 GenBank 中进行同源性搜索, 结果发现, 4 个 cDNA 片段序列与已报道的序列无明显同源性, 剩下 8 个序列和 GenBank 中已报道的序列具有很高的同源性, 其中包括 4 个 rRNA 和 4 个功能基因(表 1)。这四个功能基因分别是全长 nm23 序列、全长铁蛋白 ferritin 序列、部分 WD40 序列和部分 COLFI 序列(另文报道)。

表 1 24 个阳性重组克隆测序结果

Tab. 1 The sequencing results of 24 positive recombinant clones

质粒	插入片断/bp	同源基因	质粒	插入片断/bp	同源基因
2 - -14	628	Ribosomal_L21e	32	640	Ribosomal_L6e
4 - -10	985	ferritin	36	785	-
5 - -10	553	-	39	538	-
5 - -11	568	-	46	439	Ribosomal_S9
II - 3	628	-	47	906	-
II - 8	614	Unknown	55	762	Unknown
II - 11	529	Ribosomal_L21e	80	643	Unknown
II - 25	705	COLFI	127	684	-
II - 27	526	-	192	631	nm23
II - 28	726	WD40	198	655	-
II - 32	594	-	214	659	-
31	351	-	221	757	Unknown

注:表中“-”表示无开放阅读框

3 讨论

由于促雄腺组织微小, 提取总 RNA 量十分有限, 采用常规的 cDNA 文库构建方法起始 RNA 量难以达到建库要求, 本研究采用 SMART 技术构建罗氏沼虾促雄腺 cDNA 文库, 最少起始总 RNA 和 mRNA 量分别只需 50 ng 或 25 ng, 利用该技术不仅可以克服样品材料来源稀少的困难, 同时还可以获得全长 cDNA 克隆。初步筛选结果表明, 测得的 24 个阳性克隆中, 有 12 个为具有开放阅读框的 cDNA 序列, 其中 4 个 rRNA、4 个功能基因、4 个新基因(表 1)。在测定的 24 个 ESTs 中, rRNA 基因的比率较高, 与组织中 rRNA 的含量较高的特点相符。有关 4 个新基因的全序列特征、表达特征和功能确定有待进一步鉴定。4 个功能基因描述如下。

nm23, 其表达产物可抑制癌细胞增殖而命名为抑癌基因, 后来研究表明它与控制细胞正常发育与分化也有关^[10]; WD40, 由约 40 个氨基酸残基组成, 包含 N-端的 GH 和 C-端的 WD 保守序列。研究表明 WD-重复蛋白与细胞中其他蛋白结合, 控制细胞的分裂与分化, 该作用在动植物间具有相当高的保守性^[11]。大多数研究表明虾类促雄腺的原基出现于个体性别分化之前, 此时雌雄体内都有促雄腺原基, 只有在雄体内会继续发育^[12]。nm23 与 WD40 是否可能参与罗氏沼虾促雄腺发育与分化有待进一步验证。

铁蛋白 ferritin, 存在于很多生物有机体中, 其主要作用是汇集细胞内的储备铁使其不具有毒性。有

研究表明铁对哺乳动物诱导精子的发生以及破坏精巢的发育具调控作用^[13-14];COLFI,其产物编码 I 型胶原蛋白,胶原蛋白具有粘连组织的作用。对中华绒螯蟹促雄腺结构与发育的研究发现,发育早期的促雄腺腺体与射精管壁有不同程度的粘连,发育晚期时该粘连变得疏松甚至脱落^[15]。在罗氏沼虾促雄腺中发现 COLFI 有表达,可能意味 COLFI 对促雄腺与射精管壁的粘连作用有关。

综上所述,本研究构建了罗氏沼虾促雄腺 cDNA 文库,经初步筛选,获得全长 cDNA 序列比率较高,并对分离的已知基因的潜在功能进行了初步推断,为将来进一步研究这些基因与促雄腺分化、发育的关系奠定了基础。由于筛选的 ESTs 序列的数目有限,还不足以代表罗氏沼虾促雄腺的全部表达序列,但所获得的这些 EST 数据为进一步大规模筛选与罗氏沼虾促雄腺调控有关的功能基因提供了技术基础。

上海水产大学生命科学院 2005 届本科生曹明、谭黎参与本研究部分实验样品采集,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Adams M D, Kelly J M, Gocayne J D, *et al.* Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project[J]. *Science*, 1991, 252: 1651 - 1656.
- [2] Benson D A, Karsch-Mizrachi I, Lipman D J, *et al.* GenBank[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 15 - 18.
- [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 - 95.
- [4] 王维新, 史成银, 黄 健. 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.
- [5] 王艺磊, 张子平. 日本对虾精巢和卵巢全长 cDNA 文库的构建[J]. *动物学杂志*, 2003, 38(2): 9 - 13.
- [6] 马长艳, 周开亚, 郭豫杰, 等. 中华绒螯蟹卵巢 RACE cDNA 文库的构建[J]. *动物学杂志*, 2003, 38(2): 14 - 16.
- [7] Chaniaux-Cotton H. Dé couverte chez un crustac é amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenetation des caract è res sexuels primaires et se comdaires males[J]. *CR Acad Sci*, 1954, 239: 780 - 782.
- [8] King D S. Fine structure of the androgenic gland of the crab *Pachygrapsus crassipes*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 1964, 4: 533 - 544.
- [9] Katakura Y. Hormonal control of development of sexual characters in the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*[J]. *Annot Zool*, 1961, 34(2): 60 - 71.
- [10] Daniela L, Marie-lise L, Marco G P. nm23: Unraveling its biological function in cell differentiation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 182: 144 - 149.
- [11] Ach R A, Taranto P, Cruissem W. A conserved family of WD-40 proteins binds to the retinoblastoma protein in both plants and animals [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1595 - 1606.
- [12] 吴 萍, 楼允东, 邱高峰. 甲壳动物雄性腺研究的进展[J]. *水产学报*, 1999, 23(1): 77 - 83.
- [13] Maria de Lourdes Pereira, Fernando García e Costa. Spermatogenesis recovery in the mouse after iron injury[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2003, 22: 275 - 279.
- [14] Merker H J, Vormann J, Gunter T. Iron-induced injury of rat testis[J]. *Andrologia*, 1996, 28(2): 67 - 73.
- [15] 邱高峰, 吴 萍, 楼允东. 中华绒螯蟹促雄腺结构与功能[J]. *水产学报*, 2000, 24(2): 108 - 112.