

文章编号:1000-0615(2004)01-0023-06

## 不同壳色皱纹盘鲍杂交家系 $J_1Rh F_1$ 全长 cDNA 文库的构建

刘 晓<sup>1</sup>, 高其康<sup>2</sup>, 张国范<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 浙江大学分析测试中心, 浙江 杭州 310029)

**摘要:**采用日本岩手县的野生皱纹盘鲍( $J_1, ♀$ )和中国的人工选育红壳色皱纹盘鲍突变体( $Rh, ♂$ )的配子,经人工授精建立了皱纹盘鲍杂交家系( $J_1Rh$ )。取  $J_1Rh$  家系 6 月龄  $F_1$  个体的软体部组织为材料,以 SMART 技术构建了全长 cDNA 文库,命名为 HD- $J_1Rh$  文库。HD- $J_1Rh$  未扩增文库的滴度为  $6.4 \times 10^5$  pfu·mL<sup>-1</sup>、重组率为 93.75%,插入片段均大于 400bp,81.25% 克隆的插入片段分布在 1000~1500bp 之间;扩增后的文库滴度为  $3.07 \times 10^9$  pfu·mL<sup>-1</sup>。表明 HD- $J_1Rh$  文库是一个高质量的 cDNA 文库,可满足进行大规模 EST 序列分析和特定发育阶段相关基因的筛选等研究的需求。

**关键词:**皱纹盘鲍;家系;cDNA 文库;杂种优势

**中图分类号:** Q75; S968.3 **文献标识码:** A

## The construction of full length cDNA library of *Haliotis discus hannai* Ino from $F_1$ offspring of $J_1Rh$ family

LIU Xiao<sup>1</sup>, GAO Qi-kang<sup>2</sup>, ZHANG Guo-fan<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Center of Analysis and Measurement, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract:** In Pacific abalone (*Haliotis discus hannai* Ino), heterosis has been widely employed in seed production for the yield improvement. Today, nearly all the Pacific abalone seeds in China have been produced by crossing of wild type animals from Chinese and Japanese populations. In order to clone and study the expression of functional genes which will be involved in the expression of heterosis of Pacific abalone, five cDNA expression libraries were constructed from different families or different developmental stages. Full length cDNA expression library, named HD- $J_1Rh$  library, was established by SMART technique using the  $\lambda$ TripEX2 as the vector. The mRNA was isolated from the tissues of  $F_1$  offspring of  $J_1Rh$  family at 6-month-old.  $J_1Rh$  family of Pacific abalone had been established in June 2002 by the hybridization between a wild-type female ( $J_1$ ) from Japan and a mutant red-shelled male ( $Rh$ ) selected from China. Heterosis in growth rate was observed in this family at the temperature of 10-15°C. The double-strand cDNA was amplified by LD-PCR. After size fractionation, the ds-cDNA was ligated to  $\lambda$ TripEX2 and the recombinant bacteriophage was packaged. The titer of the unamplified library was  $6.4 \times 10^5$  pfu·mL<sup>-1</sup> with a recombinant rate of 93.75%, and the titer of amplified library was  $3.07 \times 10^9$  pfu·mL<sup>-1</sup>. The length of insert cDNA fragment was over 400bp. All of the data suggested that the HD- $J_1Rh$  cDNA library has high titer, recombinant percentage and large insert fragment. It would be feasible to

收稿日期:2003-05-07

资助项目:国家 863 课题(2001AA621070 和 2002AA629030)、国家自然科学基金项目(30271018 和 30371117)

作者简介:刘 晓(1965-),女,浙江缙云人,研究员,理学博士,从事贝类遗传与分子生物学研究。E-mail: liuxiao@ms.qdio.ac.cn

conduct gene cloning and expressed sequence tags (ESTs) analysis.

**Key words:** *Haliotis discus hannai* Ino; family; cDNA library; heterosis

皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)是我国黄渤海区重要的海洋生物资源,也是我国重要的海水养殖对象,养殖年产量达到 2000 ~ 2500 t,并形成巨大的产业。但到目前为止,其所有养殖群体主要来自于野生亲体,因而产生了一系列问题,如病害发生频繁、生产周期长等。通过遗传改良或培育新品种以加快皱纹盘鲍的生长速度、增强其抗逆性势在必行。

由于皱纹盘鲍等贝类的移动性小,在长期的进化中不同地理群体都积累了不同程度的变异,因此,在不同地理群体或亚种间的杂交会产生不同程度的杂种优势。1997 年以来,利用从日韩等国引进的皱纹盘鲍与我国当地黄渤海区皱纹盘鲍进行大规模生产性杂交制种,直接利用  $F_1$  代的杂交优势,已在生产上取得较好的成效<sup>[1]</sup>。但是,目前国内外仅有用 RAPD 分析方法对杂种优势的形成机制进行了初步探讨<sup>[2,3]</sup>。

为了进一步研究生长和抗逆等性状的分子机制及其与之相关的功能基因,建立不同组织、器官和发育期的 cDNA 文库非常重要。近年来我国科学家相继构建了大鳞大麻哈鱼(*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[4]</sup>、D 系银鲫(*Carassius auratus gibelio*, D clone)和彩鲫(*Carassius auratus color variety*)<sup>[5]</sup>、斜带石斑(*Epinephelus coiodes*)<sup>[6]</sup>、中国对虾(*Penaeus chinensis*)<sup>[7]</sup>等水生动物的 cDNA 文库。

国外已相继报道为克隆与生长相关的功能基因而构建的黑唇鲍(*Haliotis rubra*)的 cDNA 文库<sup>[8]</sup>,为研究疣鲍(*Haliotis tuberculata*)血蓝蛋白的结构和功能而构建的 cDNA 文库<sup>[9]</sup>及为克隆纤维素酶基因而构建的皱纹盘鲍肝胰腺组织的 cDNA 文库<sup>[10]</sup>。目前国际、国内都还未见到有关采用具有特殊性状优势的皱纹盘鲍家系作为材料构建 cDNA 文库的报道。

家系(family)是经典遗传学和育种学研究的基础。自 2000 年以来,中国科学院海洋研究所及其合作单位,以来源于不同地理群体的皱纹盘鲍为亲本,分别在大连市水产研究所、青岛金瀛

海洋科技发展有限公司、荣城西霞口海珍品养殖场等地共成功培育皱纹盘鲍的家系 43 个。其中,2002 年培育的  $J_1Rh$  家系在低温条件下具有生长快、成活率高等特点。为研究皱纹盘鲍杂种优势的分子机制和相关功能基因,利用不同的实验材料构建了一系列的 cDNA 文库。本文报道了采用从  $J_1Rh$  家系  $F_1$  个体的软体部组织分离的 mRNA 构建的全长 cDNA 文库,该文库被命名为皱纹盘鲍的  $J_1Rh$  文库,即 *Haliotis discus hannai* -  $J_1Rh$  library,缩写为 HD -  $J_1Rh$  文库。

## 1 材料与方法

### 1.1 皱纹盘鲍家系的培育

皱纹盘鲍的  $J_1Rh$  家系建于 2002 年 6 月 4 日,由来自日本岩手县的野生个体  $J_1$  的卵子和来自中国种群的人工选育红壳色突变个体 Rh 的精子经人工授精培育而成。种鲍经人工促熟有效积温达 1200 $^{\circ}D$  以上,性腺发育成熟后备用。催产时,在 20 $^{\circ}C$  阴干 30 min 后,每个种鲍单独置于 1 个 20 L 的洁净容器中,加入 10 L 预热至 23 $^{\circ}C$  并经照射剂量为 400  $mW \cdot h^{-1} \cdot L^{-1}$  的紫外线预处理海水,每 30 min 左右更换 1 次新鲜的紫外线照射海水,直至有足量的配子排出。将种鲍  $J_1$  排出的卵子分为 2 份,取适量种鲍 Rh 的精子对其中的 1 份卵子进行人工授精。建立  $J_1Rh$  家系;另外 1 份卵子则用一个来自日本岩手县的野生雄鲍( $J_m$ )的精子进行人工授精,培育半同胞家系  $J_1J_m$ 。受精卵在 20 $^{\circ}C$  新鲜海水中孵化,每 40 ~ 60 min 洗卵 1 次,直至担轮幼虫从卵膜内孵出。尽可能多地选出担轮幼虫,在 20 $^{\circ}C$  新鲜海水中培育至面盘幼虫的初生壳完全长好,此后每 8 h 更换 20 $^{\circ}C$  新鲜海水 1 次,直至发育至后期面盘幼虫阶段。当大部分幼虫足发育完全后,用预先培育好的底栖硅藻板采苗。后期培育主要按文献<sup>[11]</sup>进行。实验自始至终在严格隔离的条件下进行,避免家系间的相互污染及外群对各家系的污染。取样前,该家系一直在青岛金瀛海洋科技发展有限公司鲍鱼育苗室内培育。

## 1.2 皱纹盘鲍组织样本的采集

2002 年 12 月 20 日取 J<sub>1</sub>Rh 家系不同规格的 F<sub>1</sub> 个体共 10 枚用于 cDNA 文库构建,采样前于 12℃ 恒温条件下流水培育 2 周,每日投喂人工配合饵料,采样前 20h 停止投喂。取 1/5 的肌肉组织,及除肌肉组织外的软体部全部组织于液氮中保存。

## 1.3 总 RNA 和 mRNA 提取

样本在液氮中充分研磨后,将大约 1 g 的材料转移至 50 mL 预冷的无菌离心管中,加入 20 mL 的 TRIZOL 试剂(Life Technologies)充分混匀,按试剂盒提供的方法进行总 RNA 提取。mRNA 分离采用 Promega 公司的 mRNA isolation system IV 试剂盒,操作方法见试剂盒说明。

## 1.4 cDNA 的合成和克隆

取 3 μL (约 1 μg) 的 mRNA 作模板,用引物 1 (5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGATGGCCATTACGGCCGGG - 3') 和引物 2 (5' - ATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCGACATG - d(T)<sub>30</sub>N<sub>-1</sub>N - 3') 在 PowerScript™ 逆转录酶的作用下合成第一链 cDNA;再以 2 μL 第一链 cDNA 为模板,用引物 2 和引物 3 (5' - AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT - 3') 在 PTC-225 型 PCR 仪上进行扩增,合成第二链 cDNA。PCR 条件:95℃, 5 s, 68℃, 6 min, 共 24 循环。扩增产物经过 Sfi I 酶切及 CHROMA SPIN-400 分级分离后,取 1.5 μL 的 cDNA 与 1 μL 的 λTriplEx2 载体在连接酶的作用下于 16℃ 连接过夜,在连接产物中加入 25 μL 的包装蛋白进行体外包装,所得包装产物即为 cDNA 的未扩增文库。按未扩增文库的滴度,将未扩增文库在 LB 平板上用 XL1-blue 宿主菌中进行噬菌体文库扩增,并用噬菌体缓冲液收集扩增的噬菌体,即为扩增文库。

## 1.5 cDNA 文库滴度和重组率测定

从 cDNA 未扩增文库和扩增文库中分别取 1 μL 进行如下稀释:加入噬菌体缓冲液 1000 μL,混合均匀后各取 100、10、1 μL,分别加入噬菌体缓冲液至总体积 100 μL,成为稀释倍数分别为 10<sup>1</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup> 的悬液,分别加入 100 μL 的宿主菌大肠杆菌 XL1-blue,混合均匀后铺于含 IPTG 和 X-gal 的平板上,培养过夜后分别统计噬菌斑的个数及

蓝白斑个数,按下列公式计算未扩增文库和扩增文库的滴度及扩增文库的重组率<sup>[12]</sup>:

文库滴度(pfu·mL<sup>-1</sup>) = (噬菌斑数 × 稀释倍数)/转染的噬菌体体积

重组率(%) = 白斑数/(白斑数 + 蓝斑数) × 100

## 1.6 cDNA 插入片段的 PCR 分析

从未扩增文库的 LB 平板上随机挑取 16 个克隆,分别加入到含 200 μL 噬菌体缓冲液的干净离心管中,加氯仿 1 滴,置 37℃ 培育 1 h 后于 4℃ 保存备用。以这些克隆噬菌斑为模板,引物 4 (5' - CTCCGAGATCTGGACGAGCT - 3') 和引物 5 (5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3') 对插入片段进行 PCR 扩增,以鉴定 cDNA 插入片段的长度及分布情况,并按照 PCR 扩增结果计算未扩增文库的重组率。

## 2 结果

### 2.1 皱纹盘鲍家系子代总 RNA 和 mRNA 的提取

从皱纹盘鲍 J<sub>1</sub>Rh 家系 F<sub>1</sub> 软体部组织中抽提的总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1,总 RNA 在电泳图谱上出现 28S、18S 和 5S 等 3 条清晰的带,其中 18S rRNA 的量极显著超过 28S rRNA; mRNA 呈弥散性正态分布,符合常规的 mRNA 电泳行为。

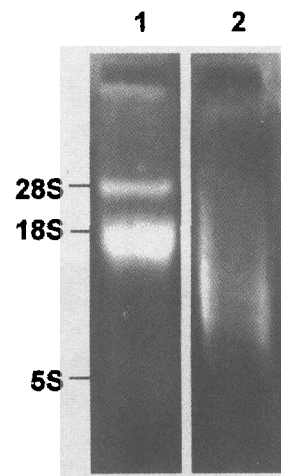


图 1 皱纹盘鲍 J<sub>1</sub>Rh 家系 F<sub>1</sub> 个体总 RNA 和 mRNA 的甲醛变性电泳  
Fig. 1 Formaldehyde denaturing gel electrophoretic analysis total RNA and mRNA of F<sub>1</sub> abalone from J<sub>1</sub>Rh family  
泳道 1:总 RNA;泳道 2:mRNA;lane 1:total RNA;lane 2:mRNA

## 2.2 cDNA 合成和分级分离

采用 Clontech 的 SMART 全长 cDNA 合成技术合成的皱纹盘鲍  $J_1$ Rh 双链 cDNA 经电泳检测, 其片段长度分布在 0.4 至 9.0kb 之间, 主要集中在 1~1.5kb(图 2)。

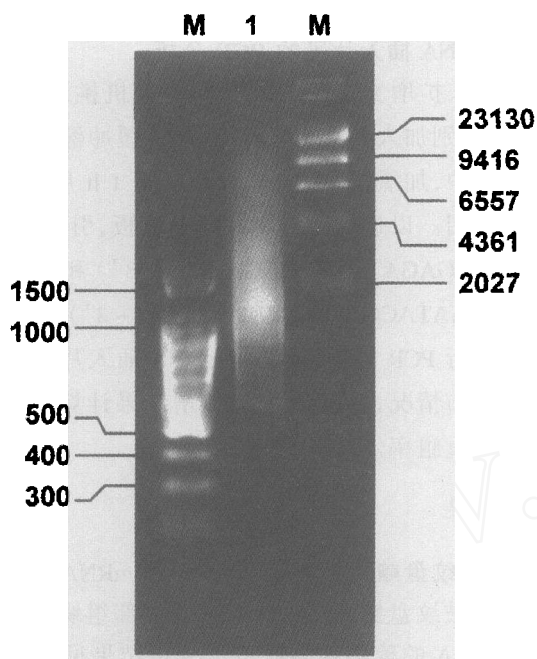


图 2 双链 cDNA 片段分布的 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Size distribution of dscDNA in 1% agarose gel

泳道 M: 标准分子量; 泳道 1: 双链 cDNA

Lane M: Marker; Lane 1: dscDNA

为提高克隆的有效率和克隆 cDNA 的长度, 采用了 Clontech 的 Chroma spin-400 柱对经 *Sfi* I 酶切的双链 cDNA 进行分级分离, 回收电泳图(图

3) 中所示的第 4 至第 10 泳道所在的 cDNA 级分, 与  $\lambda$ TriplEx2 载体连接、包装, 构建完成 HD- $J_1$ Rh cDNA 未扩增文库。

## 2.3 HD- $J_1$ Rh cDNA 未扩增文库的滴度、重组率和插入片段大小分析

将未扩增文库和扩增文库经系列浓度稀释后铺 LB 平板, 检测结果表明未扩增文库的滴度为  $6.4 \times 10^5$  pfu $\cdot$ mL $^{-1}$ , 扩增文库的滴度为  $3.07 \times 10^9$  pfu $\cdot$ mL $^{-1}$ ; 蓝白斑筛选结果表明, 扩增文库的重组率为 98.61%。

从 LB 平板上随机挑取 16 个噬菌斑进行 PCR 鉴定(图 4)。从其中 15 个克隆中成功获得了插入片段的 PCR 产物, 由此计算 HD- $J_1$ Rh cDNA 未扩增文库的重组率为 93.75%; 此外, 13 个 cDNA 克隆的插入片段大于 1000bp; 1 个克隆的插入片段约为 850bp; 仅 1 个克隆的插入片段小于 800bp, 插入片段为 450bp 左右。

## 3 讨论

滴度、重组率及插入片段的长度是鉴定 cDNA 文库质量的重要指标。一般来说, 文库的滴度能达到  $10^5$  pfu $\cdot$ mL $^{-1}$  即为有效的文库。HD- $J_1$ Rh cDNA 文库的滴度为  $6.4 \times 10^5$  pfu $\cdot$ mL $^{-1}$ , 文库的重组率为 93.75%, 插入片段均在 400bp 以上, 大多数(81.00%)分布在 1000~1500bp 之间, 说明 HD- $J_1$ Rh cDNA 文库无论从质量上, 还是数量上均符合建库要求, 可满足进行大规模 EST 序列分析和特定时期相关基因筛选等研究的需要。

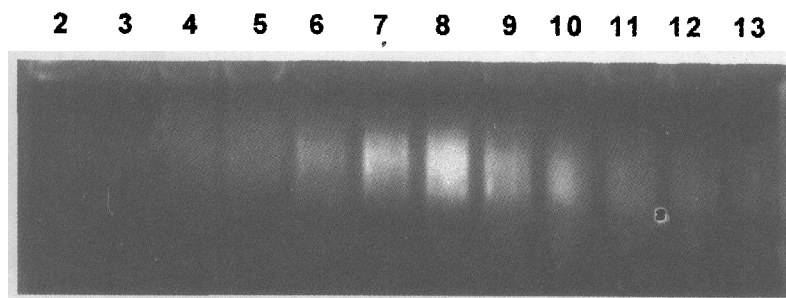


图 3 双链 cDNA 分级分离后的 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.3 1% agarose gel electrophoretic analysis of dscDNA after size fractionating

一般认为,从组织中分离的总 RNA,只有当 28S rRNA 的量大于或等于 18S rRNA 的量的 2 倍时,提取的 RNA 才符合文库构建的需要,否则表明 RNA 在提取过程中发生了降解,在中国对虾<sup>[7]</sup>、鲫<sup>[5]</sup>等水生动物组织中提取的总 RNA 都符合上述结果。值得注意的是,从 J<sub>1</sub>Rh 的软体部组织中分离的总 RNA,其 18S rRNA 的量远远超过 28S rRNA 的量(图 1),该结果与常规报道的结果不同。我们在构建皱纹盘鲍胚胎、幼虫等其它文库的过程中也都出现了相似的情况(18S rRNA 的量超过 28S rRNA 的量),并且该结果也与我们在家蚕(*Bombyx mori*)雌蛾性附腺组织<sup>[13]</sup>及蜜蜂(*Apis cerana*)头部组织等节肢动物中的总 RNA 电泳结果相同;但是我们采用同样的方法从茶树(*Camellia sinensis*)叶片中提取的总 RNA 则 18S rRNA 含量低于 28S rRNA,与常规报道的结果一致,上述结果表明,总 RNA 中 18S rRNA 和 28S rRNA 比例关系可能取决于实验材料本身的特性,

而与我们采用的 RNA 提取方法无关。

在蛋白质翻译启动过程中,mRNA 是与 40S 小亚基结合,而不与 60 大亚基结合<sup>[14]</sup>。由于 40S 小亚基是由 18S rRNA 组成,故我们推测,在一定程度上,mRNA 的量与 40S 小亚基的量成正比例关系。这表明 18S rRNA 含量较高可能预示着组织中 mRNA 水平较高、基因表达活跃。

离体组织中 RNA 降解速度很快,因此在构建 cDNA 文库时要尽可能地缩短组织的离体时间,最好是从活体材料直接提取 RNA。若客观条件不允许,则可将组织置于液氮中,运回实验室进行提取或置于 -70℃ 保存,本研究证明这一方法切实可行,能保证 RNA 不被降解,从而保证所建 cDNA 文库的完整性。当然保证 RNA 提取过程中所有的试剂、器皿都进行焦碳酸二乙酯(DEPC)处理以充分抑制 RNase 的活性,也是保证 RNA 不被降解的关键。

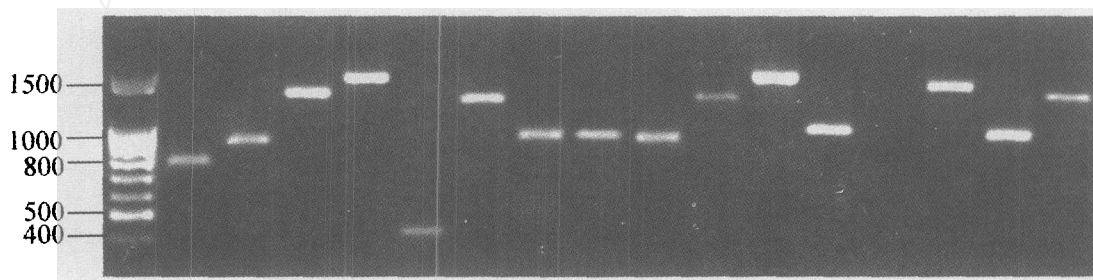


图 4 HD - J<sub>1</sub>Rh cDNA 未扩增文库插入片段的 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR analysis of 16 recombinant phage from HD - J<sub>1</sub>Rh cDNA library

在皱纹盘鲍家系的培育过程中得到青岛金藏海洋科技发展有限公司的支持,谨此表示感谢。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Zhao H E, Zhang J S. Research of new technology of artificial abalone breeding[J]. China Fisheries, 2000, (10): 42 - 45. [赵洪恩, 张金世. RHD 鲍育苗新技术的研究[J]. 中国水产, 2000, (10): 42 - 45.]
- [ 2 ] Wan J F, Wang X L, Pan J, et al. RAPD analysis of the genetic change in parent abalone and their hybrids[J]. J Ocean Univ Qingdao, 2001, 31(4): 506 - 512. [万俊芬, 汪小龙, 潘

洁, 等. 日本盘鲍 × 皱纹盘鲍子代杂交优势的 RAPD 分析[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(4): 506 - 512.]

- [ 3 ] Zhang G F, Wang J H, Zhao H E, et al. The RAPD marker of self - bred and hybrid progeny between Chinese and Japanese populations of *Halitis discus hannai* Ino[J]. Oceanol et Limnol Sin, 2002, 33(5): 484 - 491. [张国范, 王继红, 赵洪恩, 等. 皱纹盘鲍中国群体与日本群体的自交与杂交 F<sub>1</sub> 的 RAPD 标记[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(5): 484 - 491.]
- [ 4 ] Song S D, Trinh K T, Hew C L. Cloning and sequence analysis of salmon growth hormone cDNA [J]. Acta Gen Sin, 1992, 19 (4): 308 - 315. [宋诗铎, K. Y. Trinh, 丘才良. 鲑鱼生长激素 cDNA 的分子克隆和序列分析[J]. 遗传学报, 1992,

- 19(4): 308 - 315.]
- [ 5 ] Fan L C, Xie J, Wang Y, et al. Construction of oocyte cDNA library of gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp and cloning of their cyclin A<sub>1</sub> cDNAs [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 2000, 24(6): 573 - 581. [樊连春, 谢京, 汪洋, 等. 银鲫与彩鲫卵母细胞 cDNA 文库构建及周期蛋白 A<sub>1</sub> 的 cDNA 克隆 [J]. *水生生物学报*, 2000, 24(6): 573 - 581.]
- [ 6 ] Yin Z X, Wang S P, Ye Q Z, et al. Construction of cDNA library of *Epinephelus coioides* leukocytes [J]. *J Fish China*, 2001, 25(6): 538 - 541. [殷志新, 翁少萍, 叶巧真, 等. 斜带石斑白细胞 cDNA 文库的构建 [J]. *水产学报*, 2001, 25(6): 538 - 541.]
- [ 7 ] Li T W, Xiang J H, Liu R Y. Construction of cDNA library of shrimp *Penaeus chinensis* (Crustacea, decapoda) [J]. *Acta Zool Sin*, 1998, 44(2): 237 - 238. [李太武, 相建海, 刘瑞玉. 中国对虾 cDNA 文库的构建 [J]. *动物学报*, 1998, 44(2): 237 - 238.]
- [ 8 ] Huang B, Chai Z, Hanna P J, et al. Molecular sequences of two minisatellites in blacklip abalone, *Haliotis rubra* [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(9): 1653 - 1659.
- [ 9 ] Lieb B, Altenhein B, Markl J. The sequence of a gastropod hemocyanin (HtH1 from *Haliotis tuberculata*) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(8): 5675 - 5681.
- [ 10 ] Suzuki K, Ojima T, Nishita K. Purification and cDNA cloning of a cellulase from abalone *Haliotis discus hannai* [J]. *Eur J Biochem*, 2003, 270(4): 771 - 778.
- [ 11 ] Zhao H E. Breeding and cultivation of abalone [M]. Shenyang: Shen Yang Press, 1999. [赵洪恩. 鲍的增养殖 [M]. 沈阳: 沈阳出版社, 1999.]
- [ 12 ] Jin D Y, Li M F, et al. Molecular cloning, a laboratory manual (2nd ed) [M]. Beijing: Science Press, 1992, 57 - 59. [金冬雁, 黎孟枫等译. 分子克隆实验指南 (第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1992. 57 - 59.]
- [ 13 ] Gao Q K, Hu C. Construction of cDNA library of host recognition kairomen for *Telenomus theophilae* [J]. *Entomol Sin*, 2002, 9(1): 35 - 39.
- [ 14 ] Griffiths J F A, Jeffrey H M, David T S, et al. An introduction to genetic analysis [M]. New York: W. H. Freeman and Company, 1998. 399 - 405.