

文章编号:1000-0615(2009)05-0713-06

大菱鲆脾脏 cDNA 文库构建、EST 序列分析与免疫抗病相关基因的筛选

孟亮^{1,2}, 陈松林², 刘洋²

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 山东 青岛 266071)

摘要:以大菱鲆脾脏为材料,构建 cDNA 文库,通过对文库克隆的序列测定和初步生物信息学分析,共获得 3 656 个大菱鲆脾脏表达序列标签(EST)。经与 GenBank 数据库的序列比对后发现,1 891 个 EST 代表了 149 个已知基因,其余 1 765 个 EST 为未知序列。这 149 个基因大致可分为 6 类:9 个为细胞结构类(6.0%);26 个为代谢类(17.5%);45 个为细胞防御/免疫类(30.2%);43 个为基因/蛋白质表达类(28.9%);16 个为细胞信号转导/细胞交流类(10.7%);10 个无法明确分类(6.7%)。鉴定的与免疫抗病相关重要基因主要有:CC/CXC 趋化因子;主要组织相容性复合体(MHC)class I α ;C₃ 补体;天然杀伤细胞增强因子(NKEF);胸腺素 β -4/ β -12;干扰素诱导蛋白 Gig1;白介素 8 受体;STAT 4;热激蛋白 70/90 等。

关键词:大菱鲆;cDNA 文库;表达序列标签;免疫相关基因

中图分类号:Q 785;S 917

文献标识码:A

表达序列标签(expressed sequence tag, EST)是通过随机选取 cDNA 克隆进行单向测序获取的定义特定组织在特定时期表达基因的一段序列^[1-2]。通过 EST 分析,可以用来寻找功能基因,开发分子标记,分析基因时空表达状况,构建染色体物理图谱等等^[3-9]。对生物进行大规模 cDNA 测序(即 EST 计划)不仅可以检测到许多已知的有价值的基因,更可以发现许多新的未知基因^[8]。近几年来,在 NCBI 的 EST 数据库中(dbEST)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>)录入的 EST 序列增长异常迅速,到目前为止,已经收录的来自不同物种、不同组织的 EST 序列有 46 264 474 条(截止到 2007 年 10 月 5 日),其中人和小鼠占绝大多数。在硬骨鱼类的 EST 研究中,主要为斑马鱼(*Danio rerio*)1 358 222 条、大西洋鲑(*Salmo salar*)432 630 条、青鳉(*Oryzias latipes*)343 846 条、虹鳟(*Oncorhynchus*

mykiss)260 886 条,关于大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的 EST 研究还未见报道。

大菱鲆是从欧洲引进的重要海水养殖良种,具有生长速度快,肉质好,营养丰富,适应低水温等优点,在我国广泛养殖。但是由于养殖疾病频繁暴发,给大菱鲆养殖业带来了巨大的经济损失,并且大大限制了养殖业的进一步发展。虽然药物的使用能够减少疾病造成的损失,但是药物不但使病原菌产生了更高的抗药性,同时药物残留也会造成环境污染以及对人类健康造成威胁。因此,利用分子生物技术提高养殖鱼类的抗病力势在必行。本文构建了大菱鲆脾脏 cDNA 文库,通过 EST 序列的测定和分析,获得了大菱鲆 EST 序列,经生物信息学分析,鉴定得到了 149 个基因,其中与免疫抗病相关的基因 45 个。为进一步研究大菱鲆抗病基因的功能及进行大菱鲆抗病分子育种奠定了基础。

1 材料与amp;方法

1.1 大菱鲆脾脏总 RNA 提取及 mRNA 分离

大菱鲆购自青岛市南山市场。脾脏总 RNA 使用 TRIzol reagent (Qiagen) 提取,取 500 μg 脾脏总 RNA 用于 mRNA 的分离,步骤依照 QIAGEN Oligotex mRNA Kits (Midi) 说明进行。

1.2 双链 cDNA 的合成

第一链的合成 取 1 μg mRNA,加入 *Xho* I Primer 2 μL ,DEPC 水补足 24 μL ,混匀后 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,立即置于冰上 5 min,依次加入 8 μL 5 \times first strand Buffer,4 μL 0.1 mol/L DTT,2 μL 10 mmol/L dNTP,2 μL Rnasin,混匀后加入 2 μL Superscrip II,42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 50 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min。

第二链的合成 一链反应完成后,依次加入 20 μL 10 \times DNA poly I Buffer,6 μL 10 mmol/L dNTP,1 μL RNase H(2 U/ μL),10 μL DNA poly I(10 U/ μL),双蒸水补足总体积至 200 μL 。混匀后 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应 2.5 h,70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 10 min。

1.3 cDNA 末端补平及 *Eco*R I 接头的连接

在第二链反应体系中,依次加入 6 μL 10 mmol/L dNTP,2 μL BSA(10 mg/mL),2 μL T_4 DNA 聚合酶(8.7 U/ μL),稍微离心,37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 35 min。用 QIA quick PCR Purification Kit 进行纯化,最后用无水乙醇沉淀,70% 乙醇洗涤 2~3 次,干燥至无乙醇气味。往双链 cDNA 沉淀中加入 9 μL *Eco*R I(400 ng/ μL) 接头,充分溶解 cDNA 沉淀,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min 以上。依次加入 1.2 μL 10 \times ligase Buffer(内含 rATP),1.5 μL DNA ligase(5 U/ μL),混匀后,14 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

1.4 *Eco*R I 末端磷酸化及 *Xho* I 酶切

70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活连接酶 30 min,加入以下成分使接头末端磷酸化:1 μL 10 \times ligase Buffer,1 μL rATP(rATP),1 μL T_4 PNK(10 U/ μL),6 μL 双蒸水。混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min,70 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 15 min。室温平衡后,短暂离心,进行 *Xho* I 酶切和乙醇沉淀。

1.5 双链 cDNA 与载体连接

取 3 μg 双链 cDNA,依次加入 1 μL T_4 ligase 10 \times Buffer,1 μL pBlueScript II 载体,1 μL T_4 ligase(3 U/ μL),双蒸水补足 10 μL ,混匀后 14 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。连接产物脱盐纯化:加入 3 mol/L

NaAC 和无水乙醇沉淀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h,70% 乙醇洗涤两次后,加 10 μL 双蒸水。

1.6 电转化

电极杯置于冰上预冷,取 1 μL 纯化的连接产物加入 50 μL 感受态细胞,混匀,放置 10 min。调节电转仪电压为 2.1 kV,将混合物转移至电转杯,放到电转仪中,转化后迅速加入 1 mL SOC 液体培养基重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 复苏 1 h。取 10 μL 菌液涂板(每个平板涂有 X-Gal、SOC、IPTG),37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养。剩余的菌液加入等体积的 80% 甘油,-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.7 插入片断的 PCR 鉴定

随机挑取 40 个单克隆分别于 10 μL 双蒸水中,混匀,94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min。以此为模板,以 T_3 和 T_7 引物为上下游引物,进行 PCR 反应。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.8 序列测定

取适当菌液涂平板(步骤同 1.4)。随机挑选文库克隆,用 OMEGA BIOTEK Plasmid Miniprep Kit 提取质粒 DNA。以 T_3 和 T_7 为测序引物,采用 ABI 3700 DNA Sequence DNA 自动序列仪进行正反向序列测定。对于 cDNA 片断超过 1 000 bp 以上的序列,根据已经测得的序列设计引物,继续测通 cDNA。

1.9 序列分析及基因注释

分别使用 BLASTN 和 BLASTX 搜索 National Center for Biotechnology Information (NCBI)的核苷酸和蛋白质数据库,进行序列的相似性分析^[10-11]。当得到的匹配序列与所研究的 EST 序列同源性达到期望值 $<1e^{-10}$;或匹配序列在 100 bp 以上,相似性 $>50\%$ 时判定为同源序列。

2 结果

2.1 脾脏总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

用 TRIzol reagent (Qiagen) 提取的脾脏总 RNA,经 1% 甲醛变性胶电泳检测可见清晰的 28 S 和 18 S 两条 rRNA 条带,在 0.5 kb 以上有均匀的 smear 分布,表明组织总 RNA 完整性良好。分离得到的 mRNA 经核酸定量仪检测 $A_{260}/A_{280} = 2.265$,电泳检测呈良好的 smear 分布,表明

mRNA 质量良好。

2.2 cDNA 文库的构建和鉴定

用平板计数法,估算得到库容量为 2.2×10^6 ,重组与非重组克隆比例大于 80:1,通过菌落 PCR 鉴定插入片断的大小,发现插入片断平均长度为 1.1 kb。以上结果表明,我们构建的大菱鲃脾脏 cDNA 文库符合良好文库的质量标准。

2.3 序列测定与分析

共测定 3 840 个克隆,去除掉测序质量比较差或者很短 (<100 bp) 的序列共 184 条,最后获得了 3 656 条 EST 序列,平均长度为 426 bp。通过聚类分析,发现有 1 691 条 (46.3%) 为单一序列 (singletons), 1 965 (53.7%) 条序列能够拼接成 441 个重叠群 (contigs)。

经 Blast N 和 Blast X 与数据库中 DNA 和蛋白质序列进行同源性比较,结果表明有 1 891

(51.3%) 条 EST 序列能够同其他物种的已知基因相匹配。经 Blast N 比对,序列相似性 (identities) 大于 80%; Blast X 比对, identities 大于 40% 的,可以确定该基因的种类。根据上述规则,这 1891 条 EST 序列共代表了 149 个基因。其余的 1 765 (48.7%) 条 EST 序列未能找到同源序列。

根据基因的功能,将 149 个基因可以分为 6 大类:9 个为细胞结构类 (6.0%); 26 个为代谢类 (17.5%); 45 个为细胞防御/免疫类 (30.2%); 43 个为基因/蛋白质表达类 (28.9%); 16 个为细胞信号转导/细胞交流类 (10.7%); 10 个缺乏明确的信息能对其进行分类 (6.7%)。

2.4 免疫抗病相关基因的筛选

从 149 个基因中,发现了 45 个免疫抗病相关的基因 (表 1),在大菱鲃这些基因均为首次报道。

表 1 通过 EST 测序发现的大菱鲃免疫抗病相关基因

Tab. 1 Immuno- and disease resistance- related genes identified by EST sequencing

GenBank 序列号 accession number	基因名称 name of genes	序列相似性 最高的物种 species with the most similarity	相似性 (%) identity	序列长度 (bp) length	是否全长 full length (Y/N)
DQ848880	B-cell translocation gene	<i>Danio rerio</i>	74.8	452	N
DQ848882	similar to tumor protein p53 inducible protein 3	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	83.7	302	N
DQ848883	TRAF2 binding protein	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	53.7	293	N
DQ848884	STAT 4	<i>Danio rerio</i>	45.4	987	N
DQ848885	complement component C1 beta chain	<i>Gallus gallus</i>	41.2	252	N
DQ848886	interferon-inducible protein Gig1	<i>Carassius auratus</i>	43	436	N
DQ848889	interferon-inducible protein Gig2	<i>Carassius auratus</i>	50.9	302	N
DQ848890	JAK 1	<i>Gallus gallus</i>	93.1	217	N
DQ848891	HSP 70	<i>Paralichthys olivaceus</i>	90.7	533	N
DQ848937	polyubiquitin	<i>Tribolium castaneum</i>	98.7	298	N
DQ848936	cyclophilin A	<i>Chlamys farreri</i>	85.5	488	N
DQ848938	ferritin heavy chain	<i>Pagrus major</i>	94.7	438	N
DQ848939	low molecular weight polypeptide LMP7	<i>Paralichthys olivaceus</i>	86.1	415	N
DQ848940	chemokine receptor	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	50.8	263	N
DQ848897	cathepsin D	<i>Danio rerio</i>	57.3	266	N
DQ848982	CD9 antigen	<i>Salmo salar</i>	72.3	273	N
DQ848960	arsenite-resistance protein	<i>Cricetulus griseus</i>	65.3	224	N
DQ848962	T-complex protein 1 subunit gama	<i>Danio rerio</i>	87.7	483	N
DQ848963	macrophage myristoylat-ed alanine-rich C kinase substrate (MMA-C)	<i>Homo sapiens</i>	50	253	N
DQ848964	c-myc binding protein	<i>Mus musculus</i>	79.5	264	N
DQ848965	CD63-like protein	<i>Branchiostoma belcheri</i>	47	406	N
DQ848956	immunoglobulin light chain variable region	<i>Epinephelus coioides</i>	65.2	469	N
DQ848958	immunoglobulin heavy chain variable region	<i>Takifugu rubripes</i>	81.8	407	N
DQ472128	natural killer enhancing factor	<i>Paralichthys olivaceus</i>	83.6	904	Y

· 续表 1 ·

GenBank 序列号 accession number	基因名称 name of genes	序列相似性 最高的物种 species with the most similarity	相似性(%) identity	序列长度 (bp) length	是否全长 full length (Y/N)
DQ848959	MHC class Ia chain	<i>Paralichthys olivaceus</i>	65	1638	Y
DQ848967	LCP	<i>Takifugu rubripes</i>	92		N
DQ400678	complement component C ₃	<i>Paralichthys olivaceus</i>	71.7	456	N
DQ400679	NF-YB	<i>Gallus gallus</i>	82.1	502	N
DQ400680	cathepsin B	<i>Paralichthys olivaceus</i>	79.5	434	N
DQ400681	immune costimulatory protein	<i>Homo sapiens</i>	41.7	579	N
DQ400682	Thymosin beta 4	<i>Homo sapiens</i>	81.8	222	Y
DQ400683	Thymosin beta 12	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	82.5	631	Y
DQ400685	transferrin receptor	<i>Mus musculus</i>	54.5	318	N
DQ400684	copper chaperone	<i>Ovis aries</i>	64.7	369	Y
DQ400686	cell death-regulatory protein	<i>Xenopus tropicalis</i>	52.2	434	Y
DQ400687	interferon gamma inducible protein 30	<i>Mus musculus</i>	47.5	309	N
DQ400688	heat shock protein 90	<i>Paralichthys olivaceus</i>	84.8	1076	N
DQ400689	allograft inflammatory factor-1	<i>Pagrus major</i>	88	406	N
DQ400690	IL-3 receptor	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	54.8	812	N
DQ400691	IL-4 receptor 1 like	<i>Macaca mulatta</i>	66	600	N
DQ339043	isolate 1 chemokine CXC-like protein	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	38.9	510	Y
DQ339044	isolate 2 chemokine CXC-like protein	<i>Danio rerio</i>	33.6	384	N
DQ339045	isolate 3 chemokine CC-like protein	<i>Platichthys flesus</i>	72	623	Y
DQ339046	isolate 4 chemokine CC-like protein	<i>Paralichthys olivaceus</i>	72	396	N
DQ339047	isolate 5 chemokine CC-like protein	<i>Pseudosciaena crocea</i>	59	535	Y

3 讨论

EST 分析是一种发现新基因的有效方法,鱼类中已经被广泛应用于斑马鱼^[12-13],牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)^[14-15],虹鳟^[16-17],沟鲇(*Ictalurus punctatus*)^[18-19],真鲷(*Chrysophrys major*)^[8]和庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[20]的研究中。本文构建了大菱鲆脾脏 cDNA 文库,通过测序共获得 3 656 条 EST 序列,经生物信息学分析,鉴定了 149 个新的大菱鲆基因,其中免疫抗病相关基因为 45 个。

生物体某一类型细胞在特定阶段只有 10% ~ 30% 的基因能够表达,如果稀有基因(<14 拷贝/细胞)在总 mRNA 以 30% 计,根据 Clarke-Carbon 公式,要从文库中以 99% 的几率筛选到该稀有基因,则文库至少应该包含 1.7×10^5 个克隆。本研究构建的大菱鲆脾脏 cDNA 文库库容为 2.2×10^6 ,已经达到了该要求。

鱼类虽然是低等脊椎动物,但已经具备免疫的基本特征。与哺乳动物一样,其体内也存在两种免疫应答类型:先天性免疫应答和适应性免疫应答^[21]。本文获得的免疫抗病相关基因中,有些基因是参与适应性免疫应答的,例如 *IMgD*、*MHC*

等。而更多的基因是属于先天性免疫应答相关基因,包括补体 C₃、干扰素诱导蛋白、*STAT*、*JAK 1*、*CC/CXC* 趋化因子等。另外, *MMA-C* 激酶底物和细胞死亡调节蛋白为鱼类中首次发现,其功能有待进一步研究。

补体是鱼类抵抗微生物感染的主要成分^[22],存在于血清中,在被病原体或者抗原抗体复合物等多种物质激活后,能诱导炎症反应和抗体形成,介导病原体的清除^[23]。C₃ 补体是补体系统的主要成分^[24]。我们从文库中得到了大菱鲆 C₃ 补体基因的部分序列,该段 cDNA 长 456 bp,全部位于编码区之内。经序列比对,与鲤、草鱼、牙鲆等硬骨鱼类的 C₃ 补体基因高度同源。

JAK 蛋白酪氨酸激酶是近几年来鉴定出的在细胞因子信号传递过程中起重要作用的蛋白酪氨酸激酶。它可在细胞因子受体与相应配基结合后活化,并进而激活另一种信号蛋白分子“信号转导子和转录激活子”(STATs)而诱导目的基因表达^[25]。我们从文库中发现了大菱鲆 *JAK 1* 基因,在小鼠中的研究表明,*JAK 1* 基因缺失可造成胸腺的非正常发育和成熟 B 细胞数目的明显下降,同时也会影响部分细胞因子的功能^[26]。同时,我们发现了大菱鲆的 *STAT 4* 基因,该基因在淋巴细

胞增殖起重要作用,此外还能增强天然杀伤 NK 细胞(NK 细胞)的细胞毒作用^[27]。

趋化因子(chemokine)是一类小的分泌蛋白的总称,它能够引导白细胞到损伤或感染的部位^[28]。本文发现了 5 种趋化因子,包括 2 种 CXC 型趋化因子和 3 种 CC 型趋化因子。其中有 2 个 CC 型趋化因子和 1 个 CXC 型趋化因子通过测序已经获得了全长编码序列。

本文从 3 656 个 EST 序列中只鉴定到 149 个基因,主要原因是由于我们未对文库进行均一化处理,导致获得的序列重复性比较大。尤其是与蛋白质表达相关的基因,比如有 47 条序列的比对结果表明,他们都代表一个基因:ribosomal protein L11 基因。还有一个方面,是因为细胞内基因表达的丰度不同,管家基因的表达丰度本身就高于其他基因。因此,要想筛选到尽量多的基因,最好是对文库进行均一化处理;并且尽量提高文库的质量、提高库容量;测序时尽可能多的测定 EST 序列,对于发现更多的基因也是一个比较好的方法。

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: 1561 - 1566.
- [2] Boguski M S, Schuler G D. Establishing a human transcript map [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(4): 369 - 71.
- [3] Hishiki T, Kawamoto S, Morishita, *et al.* BodyMap: a human and mouse gene expression database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 136 - 138.
- [4] Ju Z, Karsi A, Kocabas A, *et al.* Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): genes and expression profile from the brain [J]. *Gene*, 2000, 261: 373 - 382.
- [5] Murakawa K, Matsubara K, Fukushima A, *et al.* Chromosomal assignments of 3'-directed partial cDNA sequences representing novel genes expressed in granulocytoid cells [J]. *Genomics*, 1994, 23: 379 - 389.
- [6] He C, Chen L, Simmons M, *et al.* Putative SNP discovery in interspecific hybrids of catfish by comparative EST analysis [J]. *Anim Genet*, 2003, 34: 445 - 448.
- [7] Cao D, Kocabas A, Karsi A, *et al.* Transcriptome of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of genes and expression profiles of the head kidney [J]. *Anim Genet*, 2001, 32: 169 - 183.
- [8] Chen S L, Xu M Y, Hu S N, *et al.* Analysis of immune-relevant genes in red sea bream (*Chrysophrys major*) spleen [J]. *Aquaculture*, 2004, 240: 115 - 130.
- [9] 李红蕾, 宋林生, 王玲玲, 等. 栉孔扇贝 EST 中微生物标记的筛选 [J]. *高技术通讯*, 2003, 12: 72 - 75.
- [10] Altschul S F, Gish W, Myers E W, *et al.* Basic local alignment search tool [J]. *J Mol Biol*, 1990, 215: 403 - 410.
- [11] Altschul S F, Madden T L, Schaffer A A, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 3389 - 3402.
- [12] Gong Z, Yan T, Liao J, *et al.* Rapid identification and isolation of zebrafish cDNA clones [J]. *Gene*, 1997, 201: 87 - 98.
- [13] Gong Z. Zebrafish expressed sequence tags and their applications [J]. *Methods in Cell Biology*, 1999, 60: 213 - 233.
- [14] Kono T, Kusuda R, Kawahara E, *et al.* The analysis of immune responses of a novel CC-chemokine gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Vaccine*, 2003, 21: 446 - 457.
- [15] Tomoya K, Masahiro S. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, injected with the immunostimulant peptidoglycan [J]. *Fish & Shell Fish Immunol*, 2001, 11: 357 - 366.
- [16] Dixon B, Shum B, Adams E J, *et al.* CK-1, a putative chemokine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Immunol Rev*, 1998, 16: 341 - 348.
- [17] Kono T, Sakai M. The analysis of expressed genes in the kidney of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, infected with the immunostimulant peptidoglycan [J]. *Fish & Shell Fish Immunol*, 2001, 11: 357 - 366.
- [18] Karsi A, Cao D, Li P, *et al.* Transcriptome analysis of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): initial analysis of gene expression and microsatellite-containing cDNAs in the skin [J]. *Gene*, 2002, 285: 157 - 168.
- [19] Kocabas A M, Li P, Cao D, *et al.* Expression profile of the channel catfish spleen: analysis of genes

- involved in immune functions [J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4:526-536.
- [20] Park K C, Osborne J A, Tsoi S, *et al.* Expressed sequenced tags analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) liver, kidney and spleen tissues following vaccination against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish & Shell Fish Immunol*, 2005, 18:393-415.
- [21] Kaattari S L, Piganelli J D. The specific immune response: humoral defense [M]//Iwama G, Nakanishi T. The fish immune system, organism, pathogen and environment. San Diego USA: Academic Press, 1996:207-254.
- [22] 陈怀清. 从比较免疫学看鱼类的免疫特征[J]. *动物学杂志*, 1994, 29(4):56-60.
- [23] Law S K A. Complement [M]. Oxford: IRL Press, 1995.
- [24] Ferreira A M. How *Echi nococcus* granulosus deals with complement [J]. *Parasitol Today*, 2000, 16:168-176.
- [25] Sahu A, Lambris J D. Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity [J]. *Immunol Rev*, 2001, 180:35-48.
- [26] Bolen B J, Brugge J S. Leukocyte protein tyrosine kinases: Potential targets for drug discovery [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15:371-404.
- [27] Pellegrini S, Dusanter fourt F. The structure, regulation and function of the *Janus kinase* (JAKs) and the signal transducers and activators of transcriptions (STATs) [J]. *Eur J Biochem*, 1997, 248(3):615-633.
- [28] Ihle J N. STATs: Signal transducers and activators of transcription [J]. *Cell*, 1996, 84:331-334.

Construction of cDNA library from spleen of *Scophthalmus maximus* and identification of immune-related genes by EST sequencing

MENG Liang^{1,2}, CHEN Song-lin², LIU Yang²

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

(2. Key Lab for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

Abstract: A cDNA library was constructed from turbot, *Scophthalmus maximus*, spleen by unidirectional cloning. A total of 3 656 ESTs from the library were sequenced and compared with sequences in the GenBank database. 1 765 clones (48.3%) appeared to be completely unknown and are likely to represent newly described genes, whereas 1 891 clones (51.7%) were identified based on matches to sequences in the database. These identified clones were derived from at least 149 genes which were categorized into six categories: 9 in cell structure/motility (6.0%), 26 in metabolism (17.5%), 45 in cell defense/immunity (30.2%), 43 in gene/protein expression (28.9%), 16 in cell signal transduction/communication (10.7%), and 10 genes lacking enough information to be classified (6.7%). Immune related cDNAs identified from the spleen were: *CC/CXC* chemokine, *MHC* class I α , complement component C₁/C₃, natural killer cell enhancing factor (NKEF), thymosin beta-4/ beta-12, interferon inducible protein Gig1, IL-B4 receptor, STAT4, and hot shock protein 70/90.

Key words: turbot (*Scophthalmus maximus*); cDNA library; expressed sequence tag (EST); immune-related genes