

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00783

嗜水气单胞菌诱导的池蝶蚌血细胞 cDNA 文库的构建 和亲环蛋白基因序列的初步分析

谢 凯 徐 灵 盛军庆 曾柳根 王军花 洪一江

(南昌大学生命科学与食品工程学院, 南昌 330031)

摘要: 实验利用灭活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)诱导处于四龄池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)14h, 将诱导后的池蝶蚌血细胞的总 RNA 进行逆转录, 用 LD-PCR 法合成双链 cDNA, 从而首次成功构建池蝶蚌血细胞的全长 cDNA 文库。原始文库的滴度为 4×10^6 cfu/cm³, 重组率为 90%, 扩增后文库的滴度为 3.55×10^9 pfu/mL。目前文库已随机测序 672 个样品, 将所得双向序列进行拼接, 去除载体, 并多序列比对去除重复序列后, 发现 436 条为已知功能序列, 其余为未知功能序列。序列中最小长度 270 bp, 最大长度为 2153 bp, 平均大小 608.6 bp, 表明插入片段大小理想。从文库中筛选获得免疫相关基因池蝶蚌亲环蛋白 A(*HsCyp A*)全长基因并进行序列分析。结果显示, *HsCyp A* 全长 1229 bp, 序列包括 52 bp 的 5'非编码区、495 bp 的开放阅读框、682 bp 的 3'非编码区和 29 bp 的 poly(A)尾, 没有明显的加尾信号。对 *Cyp A* 氨基酸序列二级结构进行了较详细的分析并进行了三维建模, 同时构建了其系统进化树, 分析表明亲环蛋白家族是一个在进化上非常保守的蛋白家族。综合分析, *Cyp A* 在水生动物中不仅仅只是一种组成型蛋白, 而是可能在病原感染防御中发挥重要作用。

关键词: 池蝶蚌; 血细胞; cDNA 文库; 嗜水气单胞菌; 亲环蛋白

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)05-0783-07

有关低等动物全长 cDNA 文库的建立已有较多报道, 如: 锯缘青蟹^[1](*Scylla serrata*)、皱纹盘鲍^[2,3](*Haliotis discus hannai*)、中国对虾^[4](*Fenneropenaeus chinensis*)及九孔鲍^[5](*Haliotis diversicolor supertexta*)等的不同组织 cDNA 文库, 但在淡水育珠蚌中尚未见报道。池蝶蚌(*Hyriopsis schlegelii*)原产于日本滋贺县的琵琶湖, 属软体动物门、瓣鳃纲、蚌科、帆蚌属, 与我国三角帆蚌为同属不同种, 1997 年由江西抚州市洪门水库开发公司从日本引进, 1998 年人工繁殖成功。池蝶蚌的育珠能力优于其他淡水育珠蚌, 对该品种的育珠性能、人工繁殖、同工酶比较、杂交后代性状、育珠和胚胎发育、血细胞分型、免疫方面等相关基因等方面的研究已全面开展并已有的一些报道^[6-12]。

本文利用灭活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)诱导处于旺盛生长期的四龄池蝶蚌, 提取诱导后的血细胞的总 RNA, 首次构建淡水育珠蚌池蝶蚌血细胞 cDNA 文库, 通过随机测序获得免疫相关基因并进行序列分析, 为后续功能研究提供了较为全面的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

诱导用嗜水气单胞菌为本实验室永久保存种, 池蝶蚌采自江西抚州市洪门水库开发公司国家级池蝶蚌良种场, 四龄, 健康。置于实验室水族箱中暂养, 水温为 18—25℃, 每天上午和下午换曝气的水各一次。CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction

收稿日期: 2010-07-02; 修订日期: 2011-04-26

基金项目: 国家公益性行业科研专项(200903028); 江西省科技攻关项目(2009BNA07400); 江西省自然科学基金(2008GZN0070); 江西省教育厅科技项目(GJJ10306)资助

作者简介: 谢凯(1984—), 男, 湖南岳阳人; 硕士研究生; 主要研究方向为水生生物学。E-mail: xiekai2001@126.com

通讯作者: 洪一江(1963—), 男, 福建南安人; 教授, 博导; 主要研究方向为水生生物学。E-mail: yjhong2008@163.com

Kit、Advantage™ 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司; PrimeScript™ Reverse Transcriptase 购自 TAKARA 公司; TRIzol Reagent 和大肠杆菌 DH10B 电转感受态细胞购自 Invitrogen 公司。

1.2 实验用蚌的诱导

参考魏玉西等^[13]的方法,并略加改进制备嗜水气单胞菌灭活菌液,将 0.5 mL 制备好的嗜水气单胞菌灭活菌液(1.2×10^9 /mL)向池蝶蚌大闭壳肌注射,放回曝气池中诱导 14h。

1.3 池蝶蚌血细胞 cDNA 文库的构建和质量检测

用 Invitrogen 公司的 TRIzol reagent 提取血细胞总 RNA。分光光度计和变性电泳检测。参照 Creator™ SMART™ cDNA Library Construction Kit 用户手册构建文库:用 PrimeScript™ Reverse Transcriptase 合成第一链,通过 LD-PCR 合成第二链,分别电泳检测。接着蛋白酶 K 消化和 *Sfi* I 酶切形成黏性末端,用 CHROMA SPIN-400 柱小心进行分级分离以去除接头碎片和小片段 cDNA 分子。将分级分离后的产物连接至 pDNR-LIB 载体,并通过 Bio-rad 公司 Gene Pulcer X Cell 电转仪进行电转,转入 Invitrogen 公司大肠杆菌 DH10B 电转感受态细胞中。扩增后的文库细胞样品加入等体积的含 50%甘油及终浓度 30 μ g/mL 氯霉素的灭菌冷冻培养基并混匀、分装后,液氮速冻, -70°C 下保存。

取稀释后的文库菌液涂布平板,挑取单克隆利用菌液 PCR(M13F: GTAAACGACGGCCAGT; M13R: AACAGCTATGACCATG)检测插入片段的大小。摇菌测序。

梯度稀释测定文库滴度。取 1 μ L 解冻的文库加入含 1 mL LB 液体培养基混匀即 Dilution A (1×10^3); 取 1 μ L Dilution A, 加入含 1 mL LB 液体培养基混匀即 Dilution B (1×10^6)。取 1 μ L Dilution A 加入含 50 μ L LB 液体培养基,混匀后在预热的 LB/Cm 平板上涂布平板。分别取整 50 μ L 和整 100 μ L 的 Dilution B, 并分别在新的 LB/Cm 平板上涂布平板过夜。点数克隆的数量以确定其滴度(cfu/mL)。其公式为:

$$\text{文库滴度(cfu/mL)} = \text{Dilution A 克隆数} \times 10^3 \times 10^3$$

$$\text{文库滴度(cfu/mL)} = (\text{Dilution B 克隆数} / \text{涂布体积}) \times 10^3 \times 10^3 \times 10^3$$

1.4 测序结果的初步分析

利用 vecscreen 和 BLASTN 2.2.21+程序识别并

去除测序结果中的载体序列,将正反测序的结果用 MEGA 4 软件识别、纠错,并拼接;所有序列用 Clustal X(1.83)软件做多序列比对。

1.5 池蝶蚌 *Cyp A* 基因序列及蛋白的分析

利用 NCBI 的 ORF Finder 程序对样品序列 *HsCyp A* 基因做开放阅读框分析;运用 BioEdit(版本 7.0.5.3)软件和 DNASTAR(版本 7.0)分析 *HsCyp A* 蛋白的一些基本性质,对分子量、等电点,氨基酸组成等作出分析;用 SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分析可能的信号肽序列切割位点;利用 ProtScale 程序(<http://us.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)对蛋白做疏水性分析;利用 PHD(http://cubic.bioc.columbia.edu/pp/submit_def.html)做二级结构预测分析。利用 SWISS-MODEL(版本 3.5)程序做同源建模分析;

运用 BioEdit(版本 7.0.5.3)软件对 *HsCyp A* 和其他 12 个 GenBank 上相关物种的亲环蛋白的氨基酸序列做多序列比对,用 NJ(Neighbour Joining)算法产生系统进化树。

2 结果

2.1 文库构建结果

采用 invitrogen 公司的 TRIzol Reagent 提取池蝶蚌总 RNA,检测其 A_{260}/A_{280} 值为 2.02,说明 RNA 纯度很高且没有蛋白污染;变性琼脂糖检测结果显示 RNA 完整性较好,28S rRNA、18S rRNA、5S rRNA 三条带清晰可见。总 RNA 浓度达 1512 ng/ μ L,可用于构建高质量的 cDNA 文库。

以单链 cDNA 作为模板按用户手册步骤合成第二链。检测到的 cDNA 双链呈弥散条带,长度主要集中在 100—3000 bp。

用 CHROMA SPIN-400 柱进行 cDNA 的分级分离。分级分离后去除了 200 bp 以下的 cDNA 片段。根据以上结果,合并 9—12 管,进入后续实验。

2.2 文库的质量鉴定

测得所得原始文库的滴度为 4×10^6 pfu/mL,库容量 = 滴度 \times 原始文库体积 = $4 \times 10^6 \times 6 = 2.4 \times 10^7$,PCR 法初步测定重组率为 90%,扩增文库的滴度为 3.55×10^9 pfu/mL,故库容约为 1.28×10^{12} 。

文库随机测序 672 个样品,所得双向测序结果去除载体,拼接,并多序列比对去除重复序列后,余 436 条序列,全部含有 poly A 结构。序列中最小

长度 270 bp, 最大长度 2153 bp, 片段的平均大小 608.6 bp。

2.3 *HsCyp A* 序列的开放阅读框及蛋白一级结构分析

筛库获得 *HsCyp A* 基因全长序列(GenBank 登录号 HM027883), 用 NCBI 的 ORF Finder 程序查找 *HsCyp A* 序列的开放阅读框, 其全长 1229 个碱基中, 在 53—547 位存在一个长 495 bp 的开放阅读框, 编码 164 个氨基酸。其起始密码子是 atg, 终止密码子是 taa。 *HsCyp A* 序列还包括 52 bp 的 5'非编码区(untranslated region, UTR), 682 bp 的 3'UTR 和 29 bp 的 poly(A)尾, 没有明显的加尾信号。

分析结果预测, *HsCyp A* 的 ORF 编码区蛋白的分子量为 17.26 kD, 理论等电点 pI= 8.9。 *HsCyp A* 的 164 个氨基酸中, 强碱性氨基酸(K、R、H)有 21 个, 强酸性氨基酸(D、E)有 14 个, 疏水氨基酸 (A、I、L、P、F、W、M、V)有 64 个, 不带电荷的极性氨基酸有(G、S、T、C、Y、N、Q)有 65 个。分析显示此序列没有明显的信号肽切割位点, 同时其疏水性并不强, 没有明显的跨膜区域。

2.4 *HsCyp A* 蛋白二级结构及功能预测

分析结果显示, 在 *HsCyp A* 中可能存在 6 种蛋白质 Pattern(表 1), 有 N-型天冬酰胺糖基化位点、蛋白激酶 C 磷酸化位点、酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、N-十四烷酰化位点(N-myristoylation site)、ATP/GTP-结合位点 motif A (P-loop)和肽基脯氨酰顺反异构酶(PPIase 活性)位点, 总共涉及 13 个氨基酸残基。

其中“peptidyl-prolyl cis-trans isomerase signature”

Pattern 所示为亲环蛋白 *HsCyp A* 的一个非常显著的活性位点所在, 即第 55 位精氨酸所在的序列-FKG SAFHRIIPGFMCQGG。因为单氨基酸残基替换突变体(Arg55Ala)的 PPIase 活性降低了近 1000 倍^[14]。其具有的 PPIase 活性能催化 Xaa-Pro 之间的肽键的顺反异构反应(Xaa 表示任一氨基酸)。

二级结构预测表明, *HsCyp A* 中有 43.29%的氨基酸残基暴露在蛋白质的表面, 56.71%存在于蛋白质内部。另外, *HsCyp A* 结构中既有 α 螺旋, 也有 β 折叠和 β 转角及无规则转曲, 但以 β 折叠为主。其中 α 螺旋占 11.59%, β 转角占 39.02%, 其他占 43.39%。主要有 2 个较明显和一个不很明显的 α 螺旋, 分别为 N 末端、C 末端和氨基酸位点约 95—100 的位置; 此外含有较多的较明显的 β 折叠, 均匀分布于各处。

2.5 *HsCyp A* 蛋白三级结构预测

通过 SWISS-MODEL 网页, 选择最合适的人亲环蛋白 A 同源建模池蝶蚌的亲环蛋白三维结构, 所用的同源模型人亲环蛋白 A(PDB 文件号: 1W8M_A)^[15] 氨基酸个数为 165, 与 *HsCyp A* 达到 75%的相似程度, 如此高的同源性可以有效保证所构建模型的准确性。

池蝶蚌 *Cyp A* 与 1W8M_A 的三维结构预测图(图 1): 池蝶蚌 *Cyp A* 的蛋白结构折叠为一个球状区域, 与人 *Cyp A* 的相似度非常高, 其 α 螺旋、 β 折叠及其他结构都几乎一致, 其蛋白质二级结构预测的算位点也很一致。再一次验证了亲环蛋白家族在进化中高度保守的论点^[16, 17]。

表 1 *HsCyp A* 序列蛋白 Pattern 位点

Tab. 1 Protein Pattern of *HsCyp A*

活性位点名 Pattern ID	蛋白 Pattern Proteomic patterns	作用起始位点 Location	所处氨基酸序列 Sequence
N-型天冬酰胺糖基化位点 ASN_GLYCOSYLATION	N[^P][ST][^P]	71	NGTG
蛋白激酶 C 磷酸化位点 PKC_PHOSPHO_SITE	[ST].[RK]	108	NGSQ
酪蛋白激酶 II 磷酸化位点 CK2_PHOSPHO_SITE	[ST].{2}[DE]	17	SGR
N-十四烷酰化位点 MYRISTYL	[ST].{2}[DE]	152	TKK
ATP/GTP-结合位点 motif A ATP_GTP_A	[ST].{2}[DE]	120	SAME
肽基脯氨酰顺反异构酶位点 CSA_PPIASE_1	G[^EDRKHPFYW].{2}[STAGCN][^P]	140	SWLD
		13	GGKPSG
		64	GSENGA
		70	GNGTGG
		80	GAKFAD
		146	GGDFTA
		70	GNGTGGKS
	[AG].{4}GK[ST]		
	[FY].{2}[STCNLV].FH[RH][LIVMN][LIVM].{2}F[LIVM].Q[AG]G	48	FKGSFAFHRIIPGFMCQGG

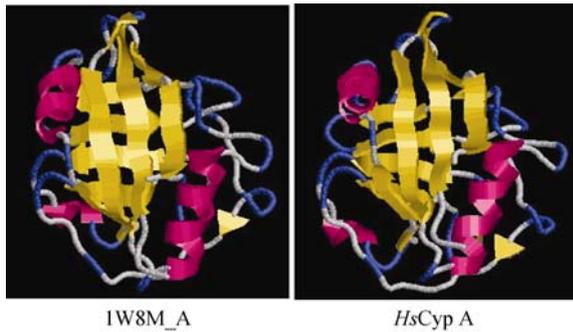


图1 池蝶蚌 Cyp A 的三维结构预测图与 1W8M_A 的三维结构图对比

Fig. 1 Three-dimensional structures of *HsCyp A* compared with 1W8M_A

2.6 *HsCyp A* 同源性分析和系统发育分析

同源分析了 13 个亲缘关系相隔较远的物种(表

表 2 不同动物亲环蛋白序列、来源及序列号
Tab. 2 CypAs from different species

名称 Name	物种拉丁名 Latin Name	来源 Source	登录号 Accession number
人	<i>Homo sapiens</i>	GenBank	AAH05982
苏门答腊猩猩	<i>Pongo abelii</i>	GenBank	NP_001126060
野猪	<i>Sus scrofa</i>	GenBank	NP_999518
欧洲野兔	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	GenBank	NP_001075526
斑马鱼	<i>Danio rerio</i>	GenBank	AAQ91263
青岛文昌鱼	<i>Branchiostoma belcheri tsingtaunense</i>	GenBank	AAQ24380
斑点叉尾鲷	<i>Ictalurus punctatus</i>	GenBank	ABO15709
大西洋鲑	<i>Salmo salar</i>	GenBank	NP_001140078
杂色蛤仔	<i>Venerupis philippinarum</i>	GenBank	ACU83230
斑节对虾	<i>Penaeus monodon</i>	GenBank	ABV90639
长牡蛎	<i>Crassostrea gigas</i>	GenBank	AAT44353
栉孔扇贝	<i>Chlamys farreri</i>	GenBank	AAR11779
池蝶蚌	<i>Hyriopsis schlegeli</i>	本实验	HM027883

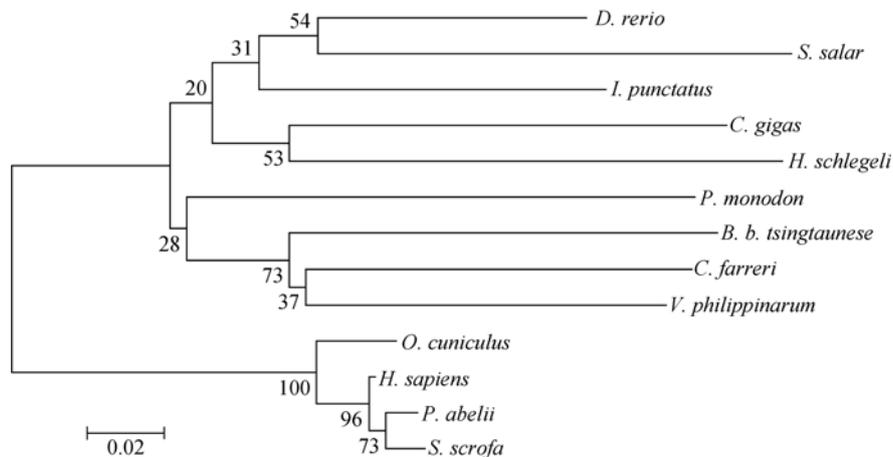


图 2 邻接法构建的池蝶蚌和其他 12 种动物 Cyps 的系统发生树
Fig. 2 Neighbor-joining tree for cyclophilins of *HsCyp A* and other Cyps

2), 它们的 Cyp A 蛋白氨基酸数目相差很小。从邻接法构建的 13 个物种 Cyp 蛋白系统进化树(图 2)来看, 尽管 Cyps 保守性很强, 但其仍旧可以根据哺乳类及水生动植物分成明显的两个分支, 但似乎鱼类和甲壳类的界限不是很明显。

3 讨论

3.1 cDNA 文库的构建

本文所构建的 cDNA 文库采用 CreatorTM SMARTTM cDNA Library Construction 构建技术, 相对于其他的建库方法, 此法可通过 Cre-loxP 重组使单个载体中的目标基因直接转移至复杂的表达受体。因此, 任何克隆至特定载体(如 pDNR-LIB 载体)的基因可转移至表达载体而不需要亚克隆步骤。

SMART 方法被认为也有自身的缺点,如不利于长片段序列的扩增,不易于得到大于 3 kb 片段和低丰度的全长基因,文库冗余性不好及 dG 加尾效率不高等。但一些改进在一定程度上弥补了这些缺点,如 Little-cycle SMART,采用终端对终端的 PCR 扩增,将循环数由 18 减少到 3 以减少 PCR 扩增对长片段的不利影响,提高了长片段克隆的可能性,也明显降低了 PCR 产生的基因错配和文库冗余^[18]。另外如 Large-size SMART,先将第一链产物按片段大小分出几个等级分别 PCR,避免了 PCR 和载体连接时对小片段的偏爱性等缺点,最长的插入片段可以达到 10 kb^[19]。目前报道的建库方法有 Oligo-Capping 法、CAPtrue 法、SMART 法、Cap-select 法、CAP-jumping 法等,但 SMART 法和 CAP-trapper 法相对比较成熟,前者应用很广泛,而后者已成功构建了老鼠、拟南芥、水稻等全长文库,全长率都在 90%左右。这两种方法在全长 cDNA 文库的构建中将有着广阔的前景。

本研究部分综合这些改进,通过嗜水气单胞菌诱导处于旺盛生长期(四龄)的池蝶蚌 14h,采用 Trizol 试剂提取诱导后的池蝶蚌血细胞的总 RNA,逐步构建池蝶蚌血细胞的全长 cDNA 文库。原始文库的滴度为 4×10^6 cfu/cm³,重组率为 90%,扩增后文库的滴度为 3.55×10^9 pfu/mL,扩增后文库库容达到 1.28×10^{12} 。目前文库共随机测序 672 个样品,所得双向测序结果去除载体,拼接,并多序列比对去除重复序列后,获得 436 条已知功能序列。插入片段大小在 270—2153 bp 之间,平均大小 608.6 bp,表明插入片段大小理想。整体评估,此文库属于高质量 cDNA 文库。特别是针对作为贝类抵御外来病原入侵主要手段之一,参与主要免疫反应的血细胞进行有效诱导而构建的这样一个 cDNA 文库,将为后续大量免疫及其他基因的研究提供良好的基础支持。同时,此文库作为首次成功构建的淡水贝类血细胞 cDNA 文库,对其他淡水贝类的研究也具有借鉴作用。

从文库目前已测序序列来看,相当部分序列仍旧是未知信息序列,这可能与软底动物等低等动物的功能基因研究较少有关。而已知基因根据与 GenBank 中序列的比对,其功能可分为以下几大类:基础代谢类基因、免疫相关基因、细胞凋亡、细胞分裂调节、蛋白质的装配、修饰与降解、DNA 合成、转录、翻译及重组相关基因和核糖体基因。同时,在

随机筛选的序列中,我们筛选到了一些在高等动物中研究比较多的免疫相关基因,如亲环蛋白、Fas 家族等,这些基因在诸如软体动物体内的具体功能是否与高等动物相同,或是否有其他的功能,还有待进一步的研究。

3.2 亲环蛋白

亲环蛋白(Cyclophilin, Cyp)发现于 1984 年,是胞内广泛分布且丰富表达的一族胞浆蛋白,因其能作为胞内受体与免疫抑制剂环孢霉素 A(cyclosporinA, CsA)结合而得名。

在高等动物中,亲环蛋白的作用涉及许多生物学过程:抑制钙调磷酸酶、肽基脯氨酸顺反异构酶的催化活性、参与多种蛋白的折叠过程、组成的超伴侣分子复合体、视觉及人类免疫缺陷病毒(HIV)和丙型肝炎的病理过程等。诸如此类有关 CyPs 的报道已经很多,然而,目前人们对于 CypA 在免疫系统的功能,特别是在水生动物这类低等动物体内的免疫功能的了解还远远不够。Song X Y, *et al.*^[20]在研究栉孔扇贝 *CypA* 时发现,经细菌诱导 4h 后性腺中 *CypA* 表达量增加 22.59 倍。这种相关性表明 *CypA* 可能在贝类防御细菌感染方面有重要作用。Yeh H Y, *et al.*^[21]研究表明经爱德华杆菌诱导斑点叉尾鲷卵巢细胞中 *CypA* 表达量上升,表明 *CypA* 在爱德华杆菌感染早期阶段扮演重要角色。Qiu L, *et al.*^[22]发现斑节对虾 LPS 诱导后肝胰脏中 *CypA* 表达量上升。综合分析,*CypA* 在水生动物中不仅仅只是一种组成型蛋白,而可能在病原感染防御中发挥重要作用。

本实验通过筛选池蝶蚌血细胞 cDNA 文库得到的亲环蛋白 A (*CypA*)全长序列,共 1229 bp,在 53—547 位存在一个长 495 bp 的开放阅读框,编码 164 个氨基酸。还包括 52 bp 的 5'非编码区,682 bp 的 3'非编码区和 29 bp 的 poly(A)尾,没有找到加尾信号。与其他许多已报道的 *CypAs* 一样,其包含一个肽基脯氨酸顺反异构酶(PPIase 活性)位点,这个位点无论在无脊椎动物还是脊椎动物中都非常保守,其定位于第 48—65 个碱基间(FKGSFAFHRIIPGFMCQGG)。这些保守的氨基酸残基对于序列一级结构及 PPIase 活性及其重要,如 R⁵⁵、Q⁶³、N¹⁰²等残基组成了肽基脯氨酸顺反异构酶的活性位点, I⁵⁷、A¹⁰¹、F¹¹³、W¹²¹、L¹²²等残基构成了与 CSA 的结合位点,以及 F⁶⁰、M⁶¹、G⁷²、A¹⁰³、Q¹¹¹、H¹²⁶等残基与 *CypA* 的其他生物功能有关^[23-26]。由此也可初步推断,这种新发现

的池蝶蚌蛋白是一种肽基脯氨酰顺反异构酶, 并且作为一个细胞内受体与免疫抑制剂 CSA 结合。

本研究还详细分析了其碱基组成、酶切谱及单酶切位点、氨基酸组成、疏水性、各类型活性位点等一系列性质, 并预测了其二级结构和三级结构, 通过与 CypA 的同源建模, 我们再一次确认 Cyps 是一类非常保守的蛋白。从邻接法构建的 13 个物种 Cyp 蛋白系统进化树(图 2)来看, 尽管蛋白序列比对和三维建模表明 Cyps 保守性很强, 但其仍旧可以根据哺乳类及水生动物分成明显的两个分支, 能够较好地根据亲缘关系上加以区分。但似乎鱼类和甲壳类的界限在此树上表现不是很明显, 表明它们的亲缘关系可能比较接近。

池蝶蚌 CypA 功能有待进一步深入研究, 理解其分子特征与其功能之间的关系对于更好地理解池蝶蚌免疫防御机理意义重大。

参考文献:

- [1] Jia X W, Wang Y L, Zhang Z P, *et al.* cDNA library construction of testis and ovary of *Scylla serrata* with SMART technique [J]. *Journal of Xiamen University* (Natural Science), 2004, **43**(4): 547—550 [贾锡伟, 王艺磊, 张子平, 等. 利用 SMART 技术构建锯缘青蟹精巢和卵巢的 cDNA 文库. 厦门大学学报(自然科学版), 2004, **43**(4): 547—550]
- [2] Liu X, Zhao M, Gao Q K, *et al.* Isolation of RNA and construction of full-length cDNA library of embryo *Haliotis discus hannai* Ino [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2006, **37**(4): 355—365 [刘晓, 赵敏, 高其康, 等. 皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai* Ino)胚胎 RNA 分离和 cDNA 文库构建. 海洋与湖沼, 2006, **37**(4): 355—365]
- [3] Zheng M G, Sun X Q, Zhang J X, *et al.* Construction of cDNA library of liver and kidney from abalone (*Haliotis discus Hannai*) and preliminary analysis of immune gene [J]. *High Technology Letters*, 2007, **17**(3): 319—324 [郑明刚, 孙修勤, 张进兴, 等. 皱纹盘鲍肝和肾 cDNA 文库的构建及免疫相关基因的初步分析. 高技术通讯, 2007, **17**(3): 319—324]
- [4] Zhang X J, Wang B, Zhang S P, *et al.* Construction of cDNA libraries from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Acta Oceanology Sinica*, 2005, **27**(5): 92—102 [张晓军, 王兵, 张绍萍, 等. 中国对虾 6 种组织 cDNA 文库的构建. 海洋学报, 2005, **27**(5): 92—102]
- [5] Wang S H, Zou Z H, Zhang Z P, *et al.* Construction a normalized full-length cDNA library of haemocytes from *Haliotis diversicolor supertexta* infected with *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2008, **27**(3): 278—285 [王淑红, 邹志华, 张子平, 等. 副溶血弧菌感染的九孔鲍血细胞均一化全长 cDNA 文库的构建. 台湾海峡, 2008, **27**(3): 278—285]
- [6] Wang J, Hong Y J, Wang J H, *et al.* The genetic variation among population of *Hyriopsis schlegelii* and *Hyriopsis cumingii* [J]. *Science Technology and Engineering*, 2005, (4): 204—209 [王静, 洪一江, 王军花, 等. 不同年龄池蝶蚌(贝)与三角帆蚌同工酶的比较. 科学技术与工程, 2005, (4): 204—209]
- [7] Li X Y, Dong Z G, Cheng H L, *et al.* Isozyme Identification of *Hyriopsis schlegelii*, *Hyriopsis cumingii* and their reciprocal hybrids F1 [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2006, **15**(2): 140—143 [李晓英, 董志国, 程汉良, 等. 池蝶蚌与三角帆蚌及其杂种 F1 的同工酶鉴别. 上海水产大学学报, 2006, **15**(2): 140—143]
- [8] Hong Y J, Yu Y, Guo H J, *et al.* The Activities of the antibacterial, bacteriolysis and phenolox- idase in the haemolymph of *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Journal of Nanchang University* (Natural Science), 2008, **32**(1): 66—69 [洪一江, 余颖, 郭红军, 等. 池蝶蚌 (*Hyriopsis schlegelii*) 血淋巴的抗菌力、溶菌酶和酚氧化酶活力. 南昌大学学报(理科版), 2008, **32**(1): 66—69]
- [9] Guo L, Sheng J Q, Hong Y J, *et al.* Microscopic observing on hemocytes of *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(6): 840—844 [郭磊, 盛军庆, 洪一江, 等. 池蝶蚌(贝)血细胞显微观察. 水生生物学报, 2008, **32**(6): 840—844]
- [10] Yu Y, Hong Y J, Qiu Q J, *et al.* Embryonic development and breeding 2 season gonad in *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2008, **43**(3): 102—107 [余颖, 洪一江, 邱齐骏, 等. 池蝶蚌胚胎发育与繁殖季节性性腺的观察. 动物学杂志, 2008, **43**(3): 102—107]
- [11] Luo J, Sheng J Q, Hong Y J, *et al.* Analysis of EST and MDH enzymes for the selected breeding of *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2008, **1**(2): 48—52 [罗洁, 盛军庆, 洪一江, 等. 人工选育池蝶蚌的 EST 和 MDH 同工酶分析. 水生态学杂志, 2008, **1**(2): 48—52]
- [12] Guo H J, LUO J, Hong Y J, *et al.* Growth and genetic analysis on the selected breeding *Hyriopsis schlegelii* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, **32**(2): 220—224 [郭红军, 罗洁, 洪一江, 等. 人工选育池蝶蚌的生长及不同世代遗传分析. 水生生物学报, 2008, **32**(2): 220—224]
- [13] Wei Y X, Guo D S, Li L, *et al.* Induction and assays of antibacterial substances from the hemolymph of several bivalve mollusks [J]. *Marine Sciences*, 2002, **26**(8): 5—8 [魏玉西, 郭道森, 李丽, 等. 几种海产双壳贝类血淋巴中抗菌物质的诱导及其活性测定. 海洋科学, 2002, **26**(8): 5—8]
- [14] Helekar S A, Patrick J. Peptidyl prolyl cis-trans isomerase activity of cyclophilin A in functional homo-oligomeric receptor expression [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**(10): 5432—5443
- [15] Kontopidis G, Taylor P, Walkinshaw M D. Enzymatic and structural characterization of non-peptide ligand-cyclophilin complexes [J]. *Acta Crystallographica Section D-biological Crystallography*, 2004, **60**: 479—485
- [16] Koletsky A J, Harding M W, Handschumacher R E. Cyclophilin: distribution and variant properties in normal and neoplastic tissues [J]. *The Journal of Immunology*, 1986, **137**(3): 1054—1059
- [17] Ryffel B, Woerly G, Greiner B, *et al.* Distribution of the

- cyclosporine binding protein cyclophilin in human tissues [J]. *Immunology*, 1991, **72**(3): 399—404
- [18] Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, *et al.* Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction [J]. *Biotechniques*, 2001, **30**(4): 892—897
- [19] Wellenreuther R, Schupp I, Poustka A, *et al.* SMART amplification combined with cDNA size fractionation in order to obtain large full-length clones [J]. *BMC Genomics*, 2004, **5**(36): 1—8
- [20] Song X Y, Wang L L, *et al.* A cyclophilin A inducible expressed in gonad of zhikong scallop *Chlamys farreri* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2009, **36**: 1637—1645
- [21] Yeh H Y, Klesius P H. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, cyclophilin A and B cDNA characterization and expression analysis [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, **121**: 370—377
- [22] Qiu L, Jiang S, Huang J, *et al.* Molecular cloning and mRNA expression of cyclophilin A gene in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **26** (1): 115—121
- [23] Dornan J, Taylor P, Walkinshaw M D. Structures of immunophilins and their ligand complexes [J]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, **3**: 1392—1409
- [24] Tu H B, Yang W L, Jiang X Y, *et al.* Cloning, sequence analysis and evolutionary conservation of a full-length cDNA encoding cyclophilin A from red stingray *Dasyatis akajei* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, **15**: 359—366
- [25] Piotukh K, Gu W, Kofler M, *et al.* Cyclophilin A binds to linear peptide motifs containing a consensus that is present in many human proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, **280**: 23668—23674
- [26] Mark P, Nilsson L. A molecular dynamics study of cyclophilin A free and in complex with the Ala-Pro dipeptide [J]. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 2007, **36**: 213—224

THE FULL-LENGTH cDNA LIBRARY OF HEMOCYTE INDUCED BY *AEROMONAS HYDROPHILA* AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF CYCLOPHILIN A FROM *HYRIOPSIS SCHLEGELII*

XIE Kai, XU Ling, SHENG Jun-Qing, ZENG Liu-Gen, WANG Jun-Hua and HONG Yi-Jiang

(College Life Science and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: *Hyriopsis schlegelii*, originated from the Lake BIWA of Japan, was introduced into China in 1997. In order to seek for genes related to the freshwater mussel on immune system, a full-length haemocytes cDNA library was constructed by using SMART (switching mechanism at 5' end of the RNA transcript) technique. The total RNA was isolated from the four years old mussel blood hemocyte induced by *Aeromonas hydrophila* for 14 hours. The “anchor first-strand cDNA” containing a sites (A & B) of symmetrical *Sfi* I restriction enzyme was synthesized by reverse transcription, and the double-strand cDNA was synthesized and amplified by LD-PCR (long-distance PCR). After digested by the proteinase K and *Sfi* I restriction enzyme, size fractionation by CHROMA SPIN-400 columns, ligated with the *Sfi* I digested pDNR-LIB vector and transformed into *E. coli* DH10B by thermal shock, the full-length cDNA library was constructed. It was the first time to construct a full-length cDNA library from blood hemocyte of the freshwater mussel. The titer of the primary constructed cDNA library was 4×10^6 cfu/cm³ with a high recombination rate of 90% and the amplified one was 3.55×10^9 cfu/cm³. 672 clones were sequenced randomly selected from the library and 436 have the homologous gene information after analyzed by BLASTx in the website of NCBI. Among the sequences, the shortest one was 270 bp and the longest one was 2153 bp, and average length was 608 bp. Results indicated it was a high quality cDNA library. The full length of the Cyp A (*HsCyp A*), which may provide immune stress function in some species, was isolated from the cDNA library by screening of *H. schlegelii*. It has 1229 base pair (bp), containing a 52 bp 5' untranslated region (UTR), a 495 bp open reading frame, a 682 bp 3'-untranslated sequence, and a 29 nucleotide long poly (A) tail. The initiator codon (ATG) and the stop codon (TAA) can be found at the position of 53 and 545, but can not find the putative polyadenylation signal (AATAAA). The predicted protein sequence consisted of 146 amino acids with a calculated molecular mass of 17.26 kD and an isoelectric point of 8.9. The secondary structure, 3D homology-modeled structure and phylogenetic analysis indicated the *HsCyp A* was extremely conservative during the evolutionary history. All the results showed that the Cyp A was not only a consistent protein, but also may play important roles in the immune system the lower aquatic animal. This work may provide important information about specific genes for mussel immune, and also provide some background for future research about the immune mechanisms of Cyp A in freshwater mussel.

Key words: *Hyriopsis schlegelii*; Hemocyte; cDNA library; *Aeromonas hydrophila*; Cyclophilin A