

重金属暴露铜锈环棱螺全组织均一化 cDNA文库构建及表达序列标签特征分析

安立会^{1,2,*}, 郑丙辉^{1,2}, 王静波³, 张雷^{1,2}, 李子成^{1,2}, 付青², 王春燕², 赵兴茹^{1,2}, 陈浩^{1,2}, 王丽靖¹, 尚晶晶^{1,2}

1. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室, 北京 100012
2. 中国环境科学研究院国家环境保护河口与海岸带重点实验室, 北京 100012
3. 北京市水产技术推广站, 北京 100021

摘要: 构建 cDNA文库是寻找生物新功能基因的有效手段。采用 SMART技术构建了重金属铜和镉暴露铜锈环棱螺全组织均一化 cDNA文库, 文库库容为 1.78×10^6 克隆, 重组率大于 99%。从初始文库中随机挑取 6 000 个克隆进行测序, 获得 5 473 个高质量表达序列标签 (ESTs) 序列。经聚类分析得到 3 961 个 Unigene (平均长度为 815 bp), 其中包含 897 条重叠群 (Contigs), 3 604 条单拷贝 EST 序列 (Singles), 冗余度为 27.63%。对 EST 序列进行相似性功能分类 (COG)、标准基因词汇体系 (GO) 功能分类和基因与基因组 (KEEG) 代谢途径的生物信息学分析。结果表明此文库含有大量的生长发育、细胞信号传导机制和生物防御机制等相关基因, 为进一步筛选铜锈环棱螺功能基因奠定了生物信息学基础, 也为发展铜锈环棱螺毒理效应研究提供了丰富的信息资源。

关键词: 铜锈环棱螺; 重金属; 均一化 cDNA文库; 表达序列标签

文章编号: 1673-5897(2011)6-281-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Construction of Normalized cDNA Library and Analysis of Expressed Sequenced Tags Properties of *Bellamya Aeruginosa*

An Lihui^{1,2,*}, Zheng Binghui^{1,2}, Wang Jingbo³, Zhang Lei^{1,2}, Li Zicheng^{1,2}, Fu Qing², Wang Chunyan², Zhao Xingru^{1,2}, Chen Hao^{1,2}, Wang Lijing¹, Shang Jingjing^{1,2}

1. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy for Environment Sciences, Beijing 100012, China
2. State Environmental Protection Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, Chinese Research Academy for Environment Sciences, Beijing 100012, China
3. Beijing Aquaculture Technology Extension Station, Beijing 100021, China

Received 10 November 2010 accepted 28 April 2011

Abstract: Construction of normalized cDNA library is an available tool for identifying novel genes of organisms. In the present study, a cDNA library of *Bellamya Aeruginosa* exposed to heavy metals through SMART technique was constructed. The tier of cDNA library was 1.78×10^6 plaques with a recombinant rate of more than 99%. 6 000 clones selected randomly and 5 473 expressed sequenced tags (ESTs) were obtained. After processing, a total of 3 961 unigenes comprising 897 contigs and 3 064 singletons were obtained and the redundancy was 27.63%. Analy-

收稿日期: 2010-11-10 录用日期: 2011-04-28

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项 (2009ZX07528-03); 中国新型环境问题 (2009467109)

作者简介: 安立会 (1975-), 男, 副研究员, 研究方向: 环境污染环境 (生态) 毒理与风险评估。E-mail: anli@craes.org.cn

sis of EST using COG, GO and KEGG showed that a large group of genes related to growing development signal transduction mechanisms of cells defense mechanisms were obtained in the present cDNA library. The normalized cDNA library developed in the present study provides a valuable resource for further research on functional genes and ecotoxicology to *Bellamy Aenuginosa*.

Keywords: *Bellamy Aenuginosa*; heavy metal; normalized cDNA library; expressed sequenced tags (ESTs)

环境重金属污染物主要指生物毒性强的镉、铅、铬和相对较强的锌、铜、钴、镍、锡、钒等,这些重金属具有来源广、毒性强并且在生物体内具有累积效应的特性。同时,重金属因密度较大($\rho > 4.0$)而易于在沉积物中累积,当水环境和沉积物环境发生变化时,吸附在沉积物中的重金属则会向水体释放,进而对水生态系统安全造成长期影响。目前,通常是通过分析环境各介质中的化学浓度水平来表征重金属的潜在风险。重金属在环境中以多种形态存在,如碳酸盐结合态、铁锰氧化物结合态、有机结合态和硫化物结合态以及残渣态等^[1],只有那些具有生物可利用性的重金属才能被生物吸收进而对生物健康产生不利影响^[2],仅仅通过基于对环境介质化学分析进行重金属的风险评估可能会高估重金属的生态风险^[3],这就可能导致对环境重金属污染控制的“过保护”和对污染控制目标不明确。因此,在分析环境重金属化学水平的基础上,选择合适的指示生物来评价重金属污染导致的生物健康效应,可以更加客观地反映环境重金属污染潜在的生态毒理效应,对开展沉积物重金属的环境风险评价和沉积物生境质量基准研究具有重要意义。

铜锈环棱螺(*Bellamy Aenuginosa*),属软体动物门(Mollusca)、腹足纲(Gastropoda)、田螺科(Viviparidae),在我国淡水水体包括浅水河流和湖泊中广泛分布,主营底栖生活,摄食沉积物中有机碎屑、细菌和藻类等,在淡水生态系统中底栖食物网的物质循环和能量流动过程中发挥着重要作用^[4]。最近的研究表明,铜锈环棱螺对重金属如镉和铅污染具有较高的敏感性^[5-7],抗氧化酶包括超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)均能够被重金属显著诱导,因此铜锈环棱螺可作为一种监测环境重金属尤其是沉积物重金属污染的敏感指示物种。与各种生化水平上的酶活性变化相比,分子水平上的变化能够更加及时反映环境污染物包括重金属的污染状况,同时可揭示污染物影响生物的作用过程和内在发生机制,并为筛选敏感分子标志物提供信息学基础。

通过构建 cDNA文库进行大规模表达序列标签

(expressed sequenced tags, ESTs)测序被证明是一种研究基因表达和寻找新基因的有效方法^[8],已经被广泛用于筛选和发现新基因、非目标基因的表达图谱分析、基因组序列的功能注释以及连锁图谱的构建等诸多研究中^[9-11],而 SMART技术通过均一化消减高丰度表达基因的拷贝数来提高获取低丰度表达基因信息的可能性,因此 SMART技术极大促进了生物基因组学的研究进展,加快了生物基因组学在各领域的广泛应用。然而,到目前为止关于铜锈环棱螺基因组学和蛋白组学上的研究还未见有报道。因此,本研究从分子水平揭示环境重金属对生物的发生机制与过程,筛选可用于监测环境重金属污染的敏感标志物;构建了重金属暴露铜锈环棱螺的均一化 cDNA文库;获得 5 473 条与各种生理生化过程相关的高质量 EST 序列;为进一步开展铜锈环棱螺的生态毒理学研究奠定了丰富的生物信息学基础。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 化学试剂

Trizol 试剂和 Trimmer Direct kit 试剂盒购自 Invitrogen, SMART cDNA Library Construction Kit 试剂盒购自 Clontech, cDNA 回收试剂盒购自 Promega, CuCl_2 (纯度 > 98%) 和 CdCl_2 (纯度 > 99%) 购自 Fluka, 其他化学试剂购自北京化学试剂公司(优级纯)。所用引物合成和 EST 测序由上海生物工程公司完成。

1.1.2 实验生物

性成熟铜锈环棱螺采自北京郊区某自然池塘壳高 $(21.05 \pm 2.06) \text{ mm}$; 体重 $(2.07 \pm 0.52) \text{ g}$ 。采回后在实验室流水养殖(实验用水为经过活性炭过滤的自来水),期间水温 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$,每天投喂新鲜莴苣菜叶和人工配合饲料。

1.2 实验方法

1.2.1 重金属暴露铜锈环棱螺

正式实验开始前,按照急性毒性的标准方法确定铜离子和镉离子对性成熟铜锈环棱螺的 96 h 半致死浓度范围,然后分别将 10 只性成熟铜锈环棱螺持续暴露在 0.001、0.005、0.010、0.015、0.020、0.025 和

0.30 mg L⁻¹的铜离子和 0.1、0.15、2.0、2.5、3.0、3.5 和 4.0 mg L⁻¹镉离子浓度条件下 96 h 根据死亡率计算出铜离子和镉离子对铜锈环棱螺的 IC₅₀-96 h 值分别为 0.17 mg Cd²⁺ · L⁻¹ (0.14—0.20 mg Cd²⁺ · L⁻¹) 和 2.72 mg Cd²⁺ · L⁻¹ (2.41—3.07 mg Cd²⁺ · L⁻¹)。根据急性毒性实验结果, 取 30 只性成熟铜锈环棱螺随机分成 3 组 (10 只/组) 分别暴露在标准实验水 (空白)、1/10 IC₅₀-96 h 即 0.02 mg Cd²⁺ · L⁻¹、0.3 mg Cd²⁺ · L⁻¹ 的暴露体系中。实验期间每天配置暴露溶液并更换 50%, 保持水温 21 ± 1°C, 光周期为 14 (白): 10 (暗) 并每天投喂新鲜莴苣菜叶。在暴露 1 周后取环棱螺腹足、鳃、肝脏、肾脏、肠、消化腺和性腺 (精巢和卵巢) 等组织立即置于液氮冻存并长期保存。

1.2.2 提取组织总 RNA

取上述液氮冻存的铜锈环棱螺组织在液氮保护下充分研磨成粉末, 充分混匀后取适量粉末转移至 Trizo 试剂中, 迅速混匀后室温静置 5 min, 加入 100 μL 氯仿混匀, 然后 14 000 rpm 离心 5 min, 取 700 μL 上清液转移至一新的离心管中, 加入 500 μL 核酸共沉淀剂, 混匀后冰浴 10 min, 4°C 离心 10 min 弃上清液。用 100 μL 灭菌水 (含 1% DEPC) 溶解沉淀 RNA 至全溶。加入 200 μL 氯仿-酚混合液, 剧烈振荡 30 s, 离心 5 min, 取上清液加入 600 μL 无水乙醇, 混匀冰浴 10 min, 然后离心 10 min, 用 75% 酒精 (含 1% DEPC) 洗涤沉淀 2 次, 然后去除残留酒精至近干, 加入 10 μL 灭菌水 (含 1% DEPC) 溶解 RNA。紫外分光光度计测定 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀ 进行定量, 同时进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 质量。

1.2.3 cDNA 合成

取 1.5 μL (大约 2 μg) RNA 溶液置于灭菌离心管, 加入 1.5 μL 无 RNA 酶水、1 μL CDS3M、1 μL SMART-OLIGO IV 引物, 混匀后置于 80°C 水浴 2 min, 冰浴 2 min 短暂离心收集上清液。向离心管内加 2 μL Buffer、1 μL dNTP (2.5 mM)、1 μL DIT、1 μL MMLV-H 混匀后 42°C 水浴 1.5 h 完成逆转录。取 4 μL 逆转录产物, 加 8 μL 5' PCR Primer、4 μL dNTP (2.5 mM)、20 μL Buffer、4 μL DNA Polymerase 和 140 μL 灭菌水, 混匀后做 4 等分。随后进行 PCR 扩增: 95°C, 10 s; 68°C, 30 s; 72°C, 60 s。反应完成后用 PCR 回收试剂盒纯化回收 cDNA, 溶于灭菌水后置于 -20°C 保存备用。

1.2.4 cDNA 均一化与文库构建

严格按照 Clontech 的 SMART cDNA Library

Construction Kit 试剂盒操作说明构建 cDNA 文库。取 7 μL 纯化的 cDNA (约 1.2 μg) 与 4 μL 杂交缓冲液、5 μL 灭菌水充分混合, 然后温浴: 98°C 2 min; 68°C 5 h。反应停止后加入 5 μL 双链特异核酸内切酶 (DSN) 缓冲液、1 μL 不同浓度的 DSN 酶液, 混匀。置于 68°C 温浴 25 min 后加 10 μL EDTANg (10 mM) 终止反应。加 20 μL ddH₂O 混匀置于 -20°C 备用。取 1 μL 经以上均一化处理的 cDNA 以 PCR Primer M1 和 PCR Primer M2 为引物进行二轮扩增。然后取 50 μL 第二轮扩增产物相继经蛋白酶 K 和 Sfi 内切酶处理, 纯化大于 500 bp 片段。回收片段与 λ TriPE2 载体连接过夜 (16°C) 后直接转入大肠杆菌感受态细胞, 构建原始文库。

1.2.5 文库库容与质量鉴定

将 XL-blue 接于 LB 培养基中, 过夜培养后离心收集菌体, 然后用 MgSO₄ (10 mM) 悬浮。取 0.5、0.05 和 0.025 μL 原始文库置于 200 μL XL-blue 中, 培养 30 min 后平铺于 90 mm LB/MgSO₄ 平皿中, 再继续培养至出现噬菌斑, 计数库容。

随机挑取 24 单克隆菌斑于 PCR 管中, 加 25 μL 反应液, 以 M13 通用引物进行 PCR 扩增, 电泳检测文库平均插入片段大小, 同时根据插入片段计算重组率。

1.2.6 EST 测序与分析

随机挑选 6 000 个克隆菌斑进行测序 (委托上海生工生物工程技术服务公司完成序列测试)。利用 Blastn 和 Blastx 对去除载体和引物序列的 UniGene EST 序列进行比对和聚类分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 同时利用相似性功能进行分类 (COG)、标准基因词汇体系 (GO) 功能分类和基因与基因组 (KEEG) 等数据库对 UniGene 序列进行功能分类、功能与代谢途径分析^[12]。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 RNA 分离与 cDNA 合成

提取铜锈环棱螺全组织总 RNA 的 OD_{260/280} 为 2.04, OD_{230/260} 为 2.00。经琼脂糖凝胶电泳可见总 RNA 18 和 28 条带清晰 (见图 1a), 这说明提取的 RNA 质量较高可以用于后期 cDNA 合成。同时对电泳的结果发现, 本研究提取铜锈环棱螺的总 RNA 的 28 条带亮度仅为 18 条带亮度的 1/10, 这与九孔鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*)^[13]、中国对虾 (*Penaeopenaeus chinensis*)^[14]、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*)^[15] 等无脊椎动物总 RNA 电泳结果一致, 但与提取的脊椎动物总 RNA 明显不同^[16-17], 这说明无脊椎

动物核糖体 RNA亚基组成与脊柱动物存在显著差异。

将总 RNA逆转录得到 cDNA单链,随后经 PCR 扩增后形成双链 cDNA。琼脂糖凝胶电泳显示合成的双链 cDNA片段主要在 500—5 000 bp之间,并且高丰度表达的基因更多集中在 1 000—3 000 bp之间(见图 1 b)。这与锯缘青蟹和杂色鲍的 cDNA片段大小相近^[15-18]。另外,本研究采用逆转录总 RNA成 cDNA进行后继扩增和均一化。这与分离 mRNA后逆转录成 cDNA方法相比^[15-18],本方法可以有效减少分离 mRNA过程中生物信息的丢失,为筛选有效敏感标志物基因奠定了物质基础。

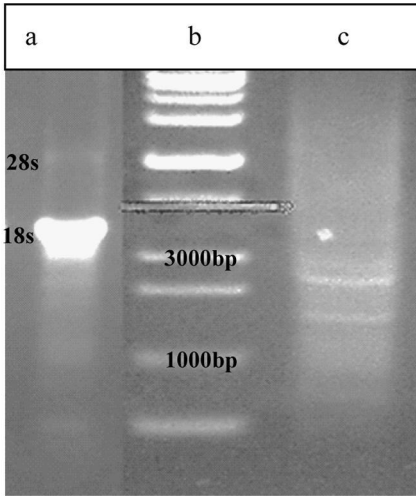


图 1 铜锈环棱螺组织 (a)总 RNA (b)Marker (c)双链 cDNA

Fig 1 Total RNA of (a) *Belkmya Aenuginoşa* (b) Marker (c) double strand cDNA

2.2 均一化 cDNA文库构建

均一化 cDNA经两轮 PCR扩增后,进行电泳检测(见图 2)。电泳的结果显示与处理前相比,经 0.5

性且更加均匀,高丰度基因得到明显消减(见图 2 d e)。生物体绝大多数基因属于中丰度或低丰度表达基因,即在单个细胞中含 1—15个拷贝,而高丰度基因,在单个细胞中含量最高可达 5 000个左右拷贝,约占总表达量的 25%^[19],这种丰度差异为基因筛选与分析带来不便。本文采用 SMART技术有效降低了高丰度表达基因含量而富集低丰度表达基因,实现不同丰度表达基因的均一化,为筛选和分析目标基因奠定了基础。

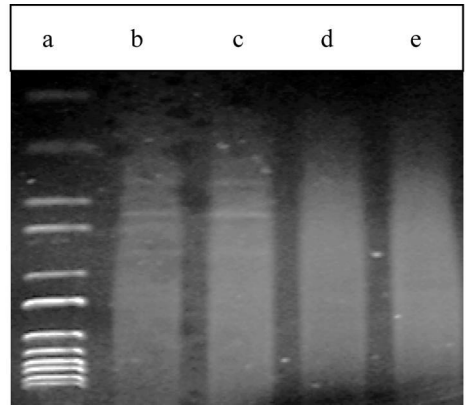


图 2 均一化前后的双链 cDNA (a) Marker (300—10 000 bp); (b) 均一化前的双链 cDNA (c) 0.25U DSN处理的双链 cDNA (d) 0.5U DSN处理的双链 cDNA (e) 1.0U DSN处理的双链 cDNA
Fig 2 Double cDNA before and after DSN treatment (a) Marker (300—10 000 bp); (b) double strand cDNA (c) normalized cDNA with 0.25 U DSN; (d) normalized cDNA with 0.5 U DSN; (e) normalized cDNA with 1.0 U DSN

2.3 文库质量分析

一个高质量文库的基本参数包括文库重组克隆介于 $5 \times (10^5 - 10^7)$,重组率大于 90%,插入 cDNA片段不小于 300 bp且平均插入片段不小于 1 kb^[20]。

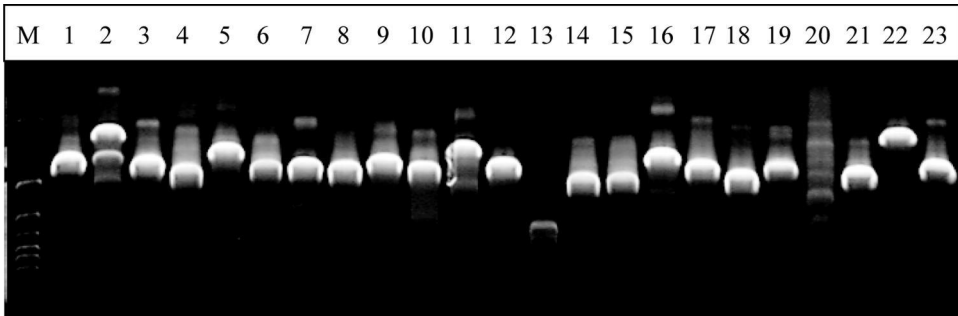


图 3 PCR检测文库插入片段大小 M: Marker (300—10 000 bp); 1—23表示质粒插入片段
Fig 3 Average size of inserts of cDNA library M: Marker (300—10 000 bp); 1—23 inserted fragments

本文构建的文库库容为 1.78×10^6 克隆。随机挑选 24 个克隆菌斑, 以 M13 正向引物和 M13 反向引物进行 PCR 扩增, 插入片段均大于 500 kb (见图 3), 重组率为大于 99%, 符合构建文库的基本参数, 说明该文库质量好, 可用于后继目标基因筛选和分析。

2.4 ESTs 测序与聚类分析

从文库中随机挑取 6 000 个克隆进行测序, 去除空载序列后获得 5 746 条有效序列; 对 5 746 条序列进行分析, 去除低质量序列后获得高质量 EST 序列 5 473 条。对 5 473 条序列进行聚类分析, 获得 3 961 条平均长度为 815 bp 的 UniGenes, 其中包含 897 条重叠群 (Contigs), 3 604 条单拷贝 EST (Singletons), 非重复序列占 72.37%, 冗余度为 27.63%, 这些数据说明本研究建立的均一化 cDNA 文库是一个高质量文库, 并且具备进一步信息挖掘的潜力, 为后继目标基因筛选和功能分析奠定了生物信息学基础。

2.5 ESTs 序列比对与生物信息学分析

对 3 961 条 UniGene 序列经 GeneBank 的核酸数据库 (Nr) 做同源比对, 643 条 EST 序列得到功能注释。其中 57 条是通过文昌鱼的基因组得到注释, 如谷胱甘肽-S 转移酶、精氨酸激酶以及假设蛋白 (hypothetical protein); 29 条是通过非洲爪蟾的基因组得到的注释, 如丝氨酸蛋白酶、抑制素相似蛋白、核糖蛋白和假设蛋白等; 18 条是通过鼠的基因组得到注释, 包括 GTP 酶、几丁质酶、蛋白酶、NADH 脱氢酶和超氧化物歧化酶 (铜) 等; 15 条是通过斑马鱼的基因组得到注释, 如 GTP 酶、细胞色素 P450 酶和丙酮脱氢酶等; 7 条是通过人的基因组得到注释, 如金属硫蛋白、球蛋白 D 和三磷酸激酶 A 等, 其余则是通过蛤仔和海葵等基因组得到注释, 包括钙依赖的蛋白激酶、超氧化物歧化酶 (铜) 和谷氨酰胺合成酶等。与非冗余蛋白库 (Nr) ($E\text{-value} < 10^{-5}$) 做同源比对, 2 315 条 ESTs 得到功能注释, 占总数的 58.4%。与 SwissProt 蛋白库 ($E\text{-value} < 10^{-10}$) 进行同源比对, 1 846 条 ESTs 得到功能注释, 占总数的 46.6%。经以上 3 个数据库查询比对后, 有 1 600 条 ESTs 序列没有得到注释, 因此我们认为本研究新发现的基因, 这些基因既丰富了现有的无脊椎动物遗传信息, 也为后期筛选新功能基因提供了材料。

对获得的 3 961 条 UniGene 序列按其序列相似性功能进行分类 (clusters of orthologous groups of proteins, COG), 789 条序列 ($E\text{-value} < 10^{-10}$) 具有相似性功能。将其按照功能分类, 蛋白质翻译后修饰与

转换相关基因 (143 条, 18.12%)、一般功能相关基因 (140 条, 17.14%) 和蛋白翻译, 以上两类 ESTs 序列占 UniGene 总量的 1/3 以上, 这说明该文库含有丰富的高丰度表达基因。另外, 核糖体结构和生物源相关基因 (71 条, 9.00%)、脂肪转运和代谢相关基因 (57 条, 7.22%)、氨基酸转运和代谢相关基因 (43 条, 5.45%)、能量转换相关基因 (36 条, 4.56%)、碳水化合物转运和代谢相关基因 (35 条, 4.44%)、无机离子转运和代谢相关基因 (30 条, 4.18%)、转录相关基因 (25 条, 3.80%)、细胞骨架相关基因 (24 条, 3.17%)、次生代谢、生物合成、转运和异化分解相关基因 (23 条, 3.04%)、复制、重组和修复相关基因 (21 条, 2.92%)、细胞信号传导机制相关基因 (19 条, 2.66%)、辅酶转运和代谢相关基因 (16 条, 2.41%)、核酸转运和代谢相关基因 (15 条, 2.03%)、细胞膜相关基因 (11 条, 1.90%)、细胞循环的控制、细胞分裂、染色体分区相关基因 (11 条, 1.39%)、细胞分泌和转运相关基因 (10 条, 1.39%)、染色质结构相关基因 (9 条, 1.27%)、RNA 加工和修复相关基因 (8 条, 1.14%)、防御机制相关基因 (6 条, 1.01%)、细胞运动相关基因 (3 条, 0.76%) 和未知功能的基因 (33 条, 0.38%), 共计 23 类 (见图 4), 以上的 EST 序列功能分类结果说明本文库包含了铜锈环棱螺的丰富生物学信息。

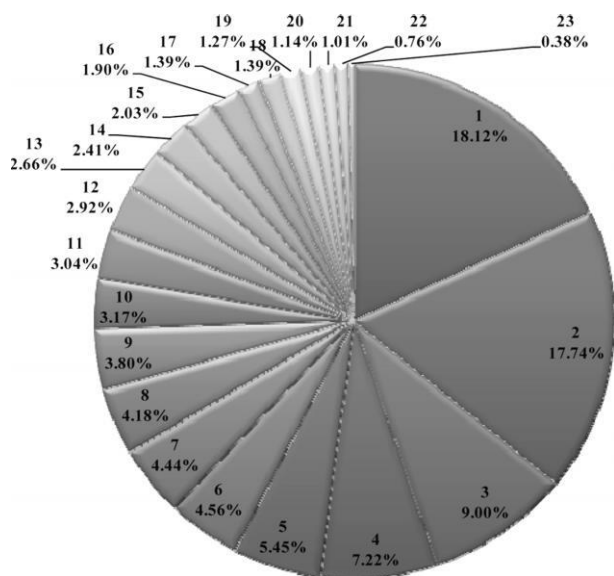


图 4 EST 序列的 COG 功能分类图

Fig. 4 COG classification of identified ESTs according to putative gene functions

根据标准基因词汇体系 (gene ontology GO) 原

则对获得的 3 961 条 ESTs 序列进行 GO 分类 ($E\text{-value} < 10^{-10}$)。结果表明有 517 个 EST 属于细胞组分 (cellular location, 13.1%)、1 264 个 EST 涉及分子功能 (molecular function, 31.9%)、938 个 EST 涉及生物学过程 (biological process, 23.7%) (见图 5)。其中, 517 个涉及细胞组分的 EST 中, 166 条 EST 序列与细胞及细胞组份功能相关。1 264 个涉及分子功能的 EST 序列中, 1 033 条 EST 序列具有分子绑定功

能, 377 条 EST 序列具有离子通道功能, 124 条 EST 序列具有催化活性 (catalytic activity), 12 条 EST 序列具有酶调节活性, 7 条 EST 具有抗氧化活性 (antioxidant activity), 4 条具有信号转导功能。938 个涉及生物学过程功能的 EST 中, 115 条 EST 序列与生物代谢相关, 104 条 EST 序列与细胞生物学过程相关, 36 条 EST 序列与生物合成过程相关, 11 条 EST 序列与生物受到刺激后的反应相关。

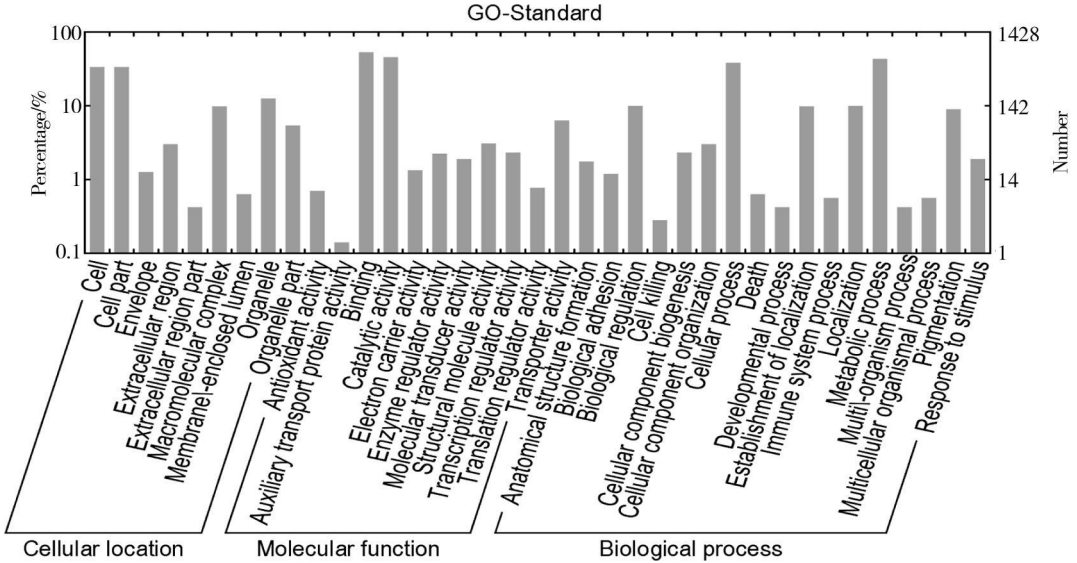


图 5 铜锈环棱螺基因的 GO 功能分类
Fig 5 GO classification of genes from DNA library of Bellamyia Aemignosa

Blast(x) 软件对 3 961 条 Unigene 序列与 KEGG 数据库的途径进行比对 ($E\text{-value} < 10^{-5}$)。其中 2 038 条序列注释到对应的生物代谢途径中, 并得到包括类固醇合成代谢、脂肪酸合成与代谢、氧化磷酸化过程和离子信号途径等多个生物生理功能注释图谱, 这为进一步定位基因功能提供了可靠的信息学依据。

2.6 与重金属胁迫相关的 ESTs

环境重金属包括生物体正常生理功能需要的铜、锌等必需重金属和镉、汞、铅等非必需金属。无论必需和非必需重金属, 在超出一定浓度后都能够导致生物体正常生物学功能发生紊乱, 并引起肾脏、肝脏、心脏、免疫和神经组织产生应激反应。其中, 生物体抗氧化系统是生物抵御外源胁迫包括重金属暴露的第一道防线。Roh 等^[21] 发现铅和镉等重金属能够诱导线虫 (Caenorhabditis elegans) 热休克蛋白、金属硫蛋白、细胞色素 P450 家族蛋白、谷胱甘肽-S 转移酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、P53 和细胞凋

亡等多个基因的表达。本研究中, 采用了 SMART 技术对混合的 DNA 进行均一化, 有效消减了高表达基因丰度同时提高了低表达基因丰度, 最终测得文库 ESTs 序列有 7 条与抗氧化相关, 3 条与谷胱甘肽-S 转移酶相关, 2 条与细胞色素 P450 家族相关, 1 条与超氧化物歧化酶有关。另外, 在对所得 EST 进行功能分类发现还有一些涉及离子通道和信号通道的 EST 序列, 这说明除了传统的作用机制, 重金属胁迫有可能涉及铜锈环棱螺的离子通道和信号通道。本文所构建的 DNA 文库中还得到了生物解毒重金属胁迫的蛋白即金属硫蛋白, 该序列与玉黍螺 Littorina littorea (AAK56498.1) 金属硫蛋白氨基酸序列具有 44% 相似性, 与扁蜗牛 Nesiohelix samarangae (ACC1783.1) 金属硫蛋白氨基酸序列具有 42% 相似性, 这说明本文所得即为铜锈环棱螺的金属硫蛋白 EST 序列, 并被重金属诱导表达。同时, 另外一种解毒重金属胁迫的蛋白即铁蛋白在本文库中也被测出, 该序列与海兔 Aplysia californica (ABF21074.1)

铁蛋白氨基酸序列具有 82% 相似性, 与太平洋牡蛎 *Crassostrea gigas* (AAF83793.1) 铁蛋白氨基酸序列具有 81% 相似性。从本文构建 cDNA 文库所得 ESTs 可以看出, 铜锈环棱螺受到环境重金属胁迫后会调动多种机制进行解毒, 这个过程涉及到多种生理生化途径和多个基因的参与。因此, 为了揭示无脊椎动物受到重金属胁迫后的具体解毒机制和筛选监测预警环境重金属污染的敏感标志物, 有必要在下一阶段通过高通量基因技术如芯片扫描筛选与重金属暴露相关的特异表达基因。

综上所述, 本研究建立了铜锈环棱螺的均一化 cDNA 文库, 库容为 1.78×10^6 克隆, 重组率大于 99%, 获得了 3 961 条 Unigene (平均长度为 815 bp), 冗余度为 27.63%。该文库为深入研究铜锈环棱螺的功能基因奠定了生物信息学基础, 为筛选监测环境重金属污染的分子标志物基因提供了丰富的信息资源。

通讯作者简介: 安立会 (1975—) 男, 环境科学博士, 副研究员。主要研究方向为污染物的环境 (生态) 毒理学和生态风险评估, 发表学术论文 20 余篇。

参考文献:

- [1] Tessier A, Campbell P G C, Bisson M. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals [J]. *Analytical Chemistry* 1979 51(7): 844—851
- [2] Liang L N, He B, Jiang G B, et al. Evaluation of molluscs as bioindicators to investigate heavy metal contaminations along Chinese Bohai Sea [J]. *Science of the Total Environment* 2004 324(1-3): 105—113
- [3] Cañaville M P, Behanno M J, Blasco J, et al. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach [J]. *Science of the Total Environment* 2000 247(2-3): 295—311
- [4] Habiđija J, Latner J, Beljic J. The contribution of gastropod biomass in macrobenthic communities of a karstic river [J]. *International Review of Hydrobiology* 1995 80(1): 103—110
- [5] 马陶武, 朱程, 周科, 等. 铜锈环棱螺对铅污染沉积物慢性胁迫的繁殖响应和氧化应激反应敏感性 [J]. *生态学报*, 2009 29(10): 5350—5357
Ma T W, Zhu C, Zhou K, et al. The reproductive reaction and oxidative stress responses sensitivity of *Belamya aeruginosa* to the chronic exposure of lead-contaminated sediments [J]. *Acta Ecologica Sinica* 2009 29(10): 5350—5357 (in Chinese).
- [6] 马陶武, 周科, 朱程, 等. 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应 [J]. *环境科学学报*, 2009 29(8): 1750—1756
Ma T W, Zhou K, Zhu C, et al. Biomarker responses of *Belamya aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 2009 29(8): 1750—1756 (in Chinese)
- [7] 马陶武, 朱程, 王桂岩, 等. 铜锈环棱螺对沉积物中重金属的生物积累及其与重金属赋存形态的关系 [J]. *应用生态学报*, 2010 21(3): 734—742
Ma T W, Zhu C, Wang G Y, et al. Bioaccumulation of sediment heavy metals in *Belamya aeruginosa* and its relations with the metals geochemical fractions [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology* 2010 21(3): 734—742 (in Chinese)
- [8] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project [J]. *Science* 1991 252(5013): 1651—1656
- [9] 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—9
Wang W X, Shi C Y, Huang J. Construction of full length cDNA library from gills of *Fenneropenaeus chinensis* [J]. *Marine Fisheries Research* 2004 25(5): 6—9 (in Chinese)
- [10] 尹俊, 扈庭茂, 李金泉. 与绵羊 KAP6-1 相似的 6 个绒山羊全长 cDNA 的克隆与序列分析 [J]. *遗传学报*, 2004 31(5): 73—78
Yin J, Hu T M, Li J Q. Cloning and analysis of six full-length cDNA similar to sheep KAP6-1 from cashmere goat [J]. *Acta Genetica Sinica* 2004 31(5): 73—78 (in Chinese)
- [11] 王绍海, 刘勇, 宫伟雁, 等. 人胎儿骨膜全长 cDNA 文库的构建及测序 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2007 4(4): 319—323
Wang S H, Liu Y, Gong W, et al. 2007. Library construction and large scale sequencing of human fetal Periosteum full length cDNA [J]. *Journal of Medical Molecular Biology* 4(4): 319—323 (in Chinese)
- [12] 周祥明, 张冰玉, 苏晓华, 等. 美洲黑杨雄性花芽 cDNA 克隆测序及表达序列标签 (ESTs) 特性分析 [J]. *林业科学*, 2006 42(11): 37—41
Zhou X M, Zhang B Y, Su X H, et al. Sequencing of cDNA clones and analysis of the expressed sequenced tags (ESTs) properties of male floral buds of *Populus deltoides* [J]. *Scientia Silvae Sinicae* 2006 42(11): 37—41
- [13] 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 [J]. *台湾海峡*, 2008 27(3): 278—285
Wang S H, Zou Z H, Zhang Z P, et al. Construction a normalized full length cDNA library of haemocytes from

- Halibut diversicolor superfecta infected with Vibrio parahaemolyticus [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait 2008 27(3): 278-285 (in Chinese)
- [14] 张晓军, 王兵, 张绍萍. 中国对虾 6 种组织 cDNA 文库的构建 [J]. 海洋学报, 2005 27(5): 92-102
Zhang X J Wang B Zhang S P. Construction of cDNA libraries from Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis [J]. Acta Oceanologica Sinica 2005 27(5): 92-102 (in Chinese)
- [15] 贾锡伟, 王艺磊, 张子平. 利用 SMART 技术构建锯缘青蟹精巢和卵巢的 cDNA 文库 [J]. 厦门大学学报 (自然科学版), 2004 43(4): 547-550
Jia X W Wang Y L Zhang Z P. cDNA library construction of testis and ovary of Scylla serrata with SMART technique [J]. Journal of Xiamen University 2004 43(4): 547-550 (in Chinese)
- [16] 张学俊, 屈刚, 朱文漓, 等. 草鱼肠道 cDNA 文库构建及部分 ESTs 分析 [J]. 水生生物学报, 2007 31(2): 251-258
Zhang X J Qu G Zhu W L et al. Construction of intestinal cDNA library and analysis of some expressed sequence tags sequencing of Ctenopharyngodon idella [J]. Acta Hydrobiologica Sinica 2007 31(2): 251-258 (in Chinese)
- [17] 刘坡, 李凯彬, 王芳, 等. 剑尾鱼肝脏 cDNA 文库的构建 [J]. 中国水产科学, 2009 16(4): 487-494
Liu B Li K B Wang F et al. Construction of cDNA library from liver of Xiphophorus helleri [J]. Journal of Fishery Sciences of China 2009 16(4): 487-494 (in Chinese)
- [18] 贾锡伟, 张子平, 邹志华, 等. 三丁基锡暴露条件下杂色鲍肝胰腺均一化 cDNA 文库的构建 [J]. 生物技术通报, 2009 (11): 136-139
Jia X W Zhang X P Zou Z H et al. Construction of normalized cDNA library from hepatopancreas of abalone haliootis diversicolor superfecta exposure to tributyltin [J]. Biotechnology Bulletin 2009 (11): 136-139 (in Chinese).
- [19] Bishop J Q Moron J G Rosbash M. Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA [J]. Nature 1974 250(463): 199-204
- [20] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999 338-339
Lu S D. Current Protocols for Molecular Biology 2nd edn [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999 338-339 (in Chinese)
- [21] Roh J Y Lee J Choi J. Assessment of stress related gene expression in the heavy metal exposed nematode Caenorhabditis elegans: A potential biomarker for metal induced toxicity monitoring and environmental risk assessment [J]. Environmental Toxicology and Chemistry 2006 25(11): 2946-2956 ◆