

石斑鱼卵巢 cDNA 文库构建及脂肪酸结合蛋白克隆*

张 勇, 张为民, 李 欣, 田 静, 林浩然

(中山大学水生经济动物研究所//水生经济动物良种繁育广东省重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 应用 SMART™ 技术构建了斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides* 卵巢 cDNA 文库。所构建的 cDNA 文库滴度为 4.5×10^6 pfu/mL, 重组率为 99%, 扩增后文库的滴度为 1.2×10^{10} pfu/mL。把 phagemid 转化为质粒后, 随机挑选 60 个阳性克隆进行酶切鉴定和测序。酶切结果表明: 插入片段长度均在 500 ~ 3 000 bp 之间。测序结果经过生物信息学分析, 发现其中一个克隆为脂肪酸结合蛋白 (FABP) 基因全长, 并与人肝型 (L) 脂肪酸结合蛋白同源性最高, 为 70%。

关键词: 斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*; cDNA 文库; 脂肪酸结合蛋白

中图分类号: Q492.5; Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0066-04

斜带石斑鱼 *Epinephelus coioides*^[1], 属于鲈形目、鲷科、石斑鱼属, 肉质鲜美, 营养丰富, 为餐桌中的上等佳肴。由于其生长快、市场价格高而稳定, 是目前我国沿海地区重要的海水养殖经济鱼类。斜带石斑鱼是一种雌性先熟的雌雄同体鱼类, 开始为雌性, 在体长为 250 ~ 400 mm 时发生性逆转, 雄性需 6 龄左右才成熟^[2], 在人工繁殖时常会遇到难以同时得到功能性雄性和雌性亲鱼的问题, 给种苗生产造成很大困难, 因此, 很有必要深入研究其性腺分化发育的机制, 以达到人工控制斜带石斑鱼性分化和性逆转的目的。构建斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库, 对于研究其性腺分化发育的基因和内分泌调节具有重要的理论价值。

脂肪酸结合蛋白 (fatty acid binding protein, FABP) 是一族具同源性的细胞内小分子蛋白质, 相对分子质量为 14 000 ~ 16 000。在哺乳动物中的研究表明: FABP 存在多种类型, 通常是以首次分离或鉴定这种 FABP 的组织命名, 如肝型 (L)、肠型 (I)、心型 (H)、脂肪细胞型 (A)、脑型 (B)、回肠型 (II)、上皮细胞型 (E)、髓磷脂型 (My) 等; 其中一些类型的 FABP 只存在于一种组织, 但有一些组织器官如肾、胃、卵巢则含多种类型 FABP; FABP 主要参与细胞内脂肪酸的运输, 将脂肪酸从细胞膜上运送到甘油三酯和磷脂合成的位点, 另外还参与调节细胞生长和分化^[3]。有关鱼类 FABP 的研究尚少, 现仅在斑马鱼^[5]、虹鳟^[6]、鲑鱼^[7]和鲨鱼^[8]的心、肝、脑等不同组织中发现了不同类型的 FABP, 如

肝型 (L)、肠型 (I)、脑型 (B), 在青鳉卵巢文库中也发现一种类似 L 型的 FABP (GenBank 登录号 AU178871)。

本文描述应用 SMART™ 技术构建了斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库, 并通过随机筛选获得了一种脂肪酸结合蛋白基因。

1 材料和方法

1.1 材 料

组织样品: 4 龄斜带石斑鱼来自广东省大亚湾水产养殖中心的海水养殖基地。实验鱼从海上网箱内捕回后直接取其卵巢组织, 取样过程均在冰上操作, 一部分卵巢组织进行石蜡包埋, 组织切片厚度 6 ~ 8 μ m, 用哈利氏苏木精-伊红染色, OLYMPUS 显微镜观察, 根据性腺外形和组织学特征定为 III 期卵巢 (图 1)。其余样品冻于液氮中, 带回实验室保存于 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱。

1.2 试 剂

SMART™ cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司。总 RNA 提取试剂 Trizol Reagent, 反转录酶 SuperScript™ II RT 购自 GibcoBrl 公司。文库包装所用的包装蛋白 MaxPlax™ Lambda Packaging Extract 购自 Epicenter Technologies 公司。其余均为国产分析纯试剂。

1.3 方 法

1.3.1 总 RNA 的提取 将 50 mg 卵巢组织放入 1 mL Trizol Reagent 中, 用组织匀浆器 (Biospec Produ-

* 收稿日期: 2002-06-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070598)

作者简介: 张勇 (1978 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 张为民; E-mail: 1-6800@zsu.edu.cn

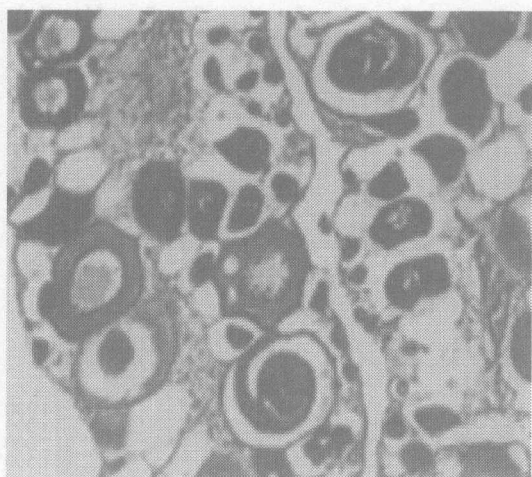


图1 4龄斜带石斑鱼卵巢组织切片

Fig.1 Ovary tissue section of
the 4-year old *Epinephelus coioides*

cts, INC 产品, 型号 985-370) 在冰上匀浆; 将匀浆液转入 1.5 mL 离心管中, 室温放置 5 min。加 0.2 mL 氯仿, 振荡 15 s, 室温放置 3 min; 4 ℃, 12 000 × g 离心 15 min; 将无色的上清液移至新的 1.5 mL 离心管; 加入异丙醇 0.5 mL, 静置 10 min 后, 4 ℃, 12 000 × g 离心 10 min; 用 $\varphi = 70\%$ 乙醇洗涤 RNA 沉淀 2 次。RNA 沉淀空气干燥后, 溶于适量 DEPC 处理的水中。利用琼脂糖凝胶电泳检查总 RNA 质量。电泳条件如下: 1 × TAE 电泳缓冲液, $w = 1.0\%$ 含有 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 溴化乙锭的琼脂糖凝胶, 电压 60 V, 时间 1.0~1.5 h。

1.3.2 cDNA 文库的构建 根据 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒操作说明书构建斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库。取 1 μg 总 RNA 用 CDS III 3' PCR Primer 和 SMART III Oligonucleotide 合成 cDNA 第一条链。再用 5' PCR Primer 和 CDS III 3' PCR Primer 引物延伸合成双链 DNA。然后经过蛋白酶 K 消化, Sfi I 酶切, 过柱 (Chroma Spin 400) 分离并收集大于 500 bp 的双链 cDNA, 与载体 $\lambda\text{TriplEx2}$ 的左右臂在 16 ℃ 下连接过夜。最后按照 MaxPlax™ Lambda Packaging Extract 的说明书进行包装。

1.3.3 文库扩增及质量检测 按照 SMART™ cDNA 文库构建试剂盒操作说明书方法对斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库进行扩增及质量检测。将扩增后的文库加 DMSO 至终体积浓度为 7%, 保存于 -70 ℃。

1.3.4 序列测定与分析 通过细菌 BM25.8, 将噬菌体 $\lambda\text{TriplEx2}$ 重组片段转入到质粒 pTriplEx2 中, 用牙签随机挑取平板上阳性单克隆, 用 OMEGA BIOTEK Plasmid Miniprep Kit 提取质粒 DNA, 进行酶切鉴定检查插入片段的长度。用 DNA 自动测序仪

(ABI377) 进行序列测定。所获得的序列结果均与国际基因库 (GenBank) 中的序列进行相似性比较。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 的提取

从 50 mg 卵巢组织中提取到 60 μg 的总 RNA。提取出的总 RNA 经分光光度计测定, $A_{260}/A_{280} \approx 2.0$, 经电泳检查, 可观察到 18s 和 28s rRNA 两条明亮的带 (图 2), 因此, 所提取的总 RNA 质量已符合要求^[9]。

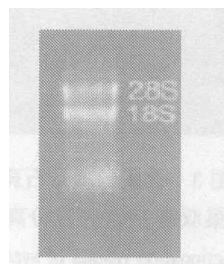


图2 卵巢总 RNA 电泳分析

Fig.2 $w = 1.0\%$ Agarose gel electrophoresis
of total RNA from ovary of *Epinephelus coioides*

2.2 cDNA 文库的构建、扩增及质量检测

用 1 μg 总 RNA 反转录合成第一条链, 经引物延伸 22 次循环合成的双链 cDNA。双链 cDNA 混合物经 Chroma Spin 400 层析柱分离, cDNA 片段大于 500 bp 的组份 (图 3) 用于文库的构建。经检测, 斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库的滴度未扩增时为 4.5×10^6 pfu/mL。文库扩增后的滴度为 1.2×10^{10} pfu/mL。经过蓝白斑计数, 文库的重组率达到 99%。把 phagemid 转化为质粒后, 随机挑选 60 个阳性克隆进行 EcoR I 酶切鉴定, $w = 1\%$ 琼脂糖凝胶电泳 (图 4) 结果显示, 所挑选的均为阳性克隆, 插入片段均大于 500 bp。美国克隆技术公司关于一个良好的基因文库的质量标准是: 原始文库的重组子数为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$, 重组率大于 90%, 插入 cDNA 片段不小于 0.3 kb, 平均插入片段大于 1 kb^[10]。根据实验结果可以看出, 所构建的斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库质量较高。

2.3 脂肪酸结合蛋白序列分析

通过与国际基因库的序列进行相似性比较, 发现获得脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 全长序列 (GenBank 序列号 AF501663), BLAST 结果表明所获得的斜带石斑鱼脂肪酸结合蛋白类似于肝型 (L), 与人 L 型脂肪酸结合蛋白具有 70% 的同源性。摘录 GenBank 的几种 L 型脂肪酸结合蛋白氨基酸序列: 人 (M10617), 大鼠 (AAA41139), 小鼠 (AAH09812), 牛 (CAA60506), 猪 (CAA54730), 鸡 (AF380999) 等, 用

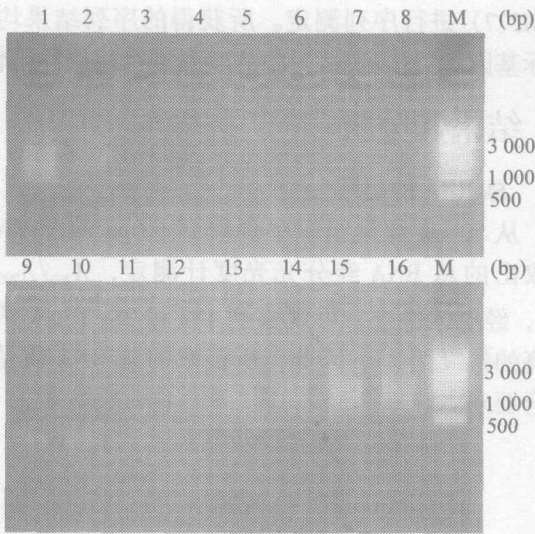


图 3 合成的斜带石斑鱼
卵巢双链 DNA 过柱分离结果

Fig.3 Fractionation results of synthesized cDNA
from ovary of *Epinephelus coioides*

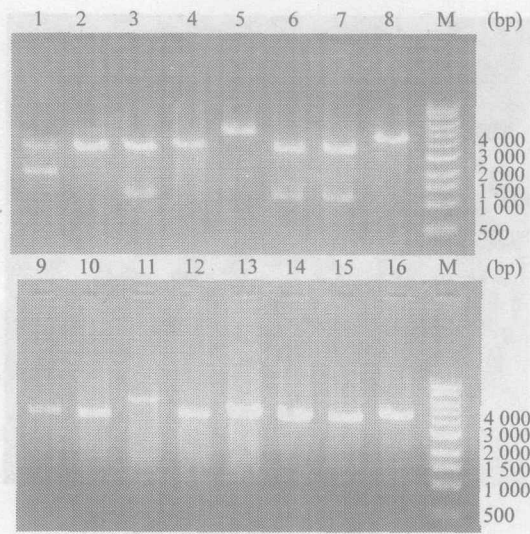


图 4 斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库
随机挑选质粒的 *EcoRI* 酶切鉴定结果

Fig.4 The restriction patterns by *EcoRI* of
the representative clones from the ovary
cDNA library of *Epinephelus coioides*

DNA STAR, Clustal W 等软件进行核苷酸序列同源性分析并比较。

3 讨 论

本文结果表明:我们成功构建了斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库,并通过随机筛选获得一种脂肪酸结合蛋白基因全长 cDNA 克隆。斜带石斑鱼是一种雌雄同体的性逆转鱼类,可作为研究鱼类性别分化发育较好的模型。通过构建斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库,一方面可以一次性永久保存基因资源,另一方面可以利用功能筛选、免疫学筛选、Southern 杂交和大规模序列测定等现代分子生物学技术来寻找与鱼类性腺分化发育和性逆转的相关的功能基因,在此基础上,深入探讨斜带石斑鱼性别分化发育的调

节机制。从斜带石斑鱼卵巢 cDNA 文库获得的脂肪酸结合蛋白,经过和其他物种脂肪酸结合蛋白的比较,初步确定为肝(L)型脂肪酸结合蛋白,表明斜带石斑鱼卵巢中存在有脂肪酸结合蛋白。在鸟类卵巢的颗粒细胞中,研究表明也存在有脂肪酸结合蛋白,而且在未成熟的滤泡中浓度最高^[11]。但目前有关鱼类及其它动物卵巢中脂肪酸结合蛋白的功能还不清楚。现有的研究表明:在动物卵巢发育过程中,卵黄蛋白的合成和性类固醇激素的生成都需要脂类的参与。在细胞内,脂肪酸的运输主要是依靠脂肪酸结合蛋白来完成的^[3],因此,脂肪酸结合蛋白可能在斜带石斑鱼卵巢生长发育过程中起着重要调节作用。

1	GGGGACCT	TCT	CTG	TCT	GCA	ACC	<u>ATG</u>	CTT	TTC	TCT	GGA	AAG	TAC	CAG	CTG	GAG	TCT	CAG	GAG	62	
1							M	L	F	S	G	K	Y	Q	L	E	S	Q	E	13	
63	AAC	TTT	GAG	GCT	TTC	AGG	AAG	GCC	ATC	GGT	CTC	CCT	GAT	GAG	CTC	ATC	CAG	AAA	GGC	AAA	122
14	N	F	E	A	F	R	K	A	I	G	L	P	D	E	L	I	Q	K	G	K	33
123	GAC	ATT	AAG	AGC	ATC	TCT	GAG	ATT	GAG	GAG	AAC	GGT	GAC	GAC	TTC	AAA	GTG	ACC	ATC	ACC	182
34	D	I	K	S	I	S	E	I	E	E	N	G	D	D	F	K	V	T	I	T	53
183	ACT	GGC	TCA	AAG	GTC	ATC	GTC	AAC	ACC	TTC	ACC	GTT	GGA	AAG	GAG	GCA	GAG	CTG	GAG	ACC	242
54	T	G	S	K	V	I	V	N	T	F	T	V	G	K	E	A	E	L	E	T	73
243	CTC	ACT	GGG	GAG	AAG	GCC	AAG	GGG	GTG	GTT	CAT	CGT	GAT	GGC	AAC	AAG	CTG	AAG	GTC	TCC	302
74	L	T	G	E	K	A	K	G	V	V	H	R	D	G	N	K	L	K	V	S	93
303	CTG	AAG	GGA	ATC	GAG	TCC	GTC	ACA	GAA	CTG	GTG	GAT	GGG	AAC	ACG	ATT	GCC	AAT	ACT	ATG	362
94	L	K	G	I	E	S	V	T	E	L	V	D	G	N	T	I	A	N	T	M	113
363	ACT	CTT	GGC	AAC	ATT	GGA	TAC	AAG	AGG	ATA	AGC	AAA	CGT	GTG	<u>TAA</u>	ATG	TGC	ACT	TGG	GAT	422
114	T	L	G	N	I	G	Y	K	R	I	S	K	R	V	*						127
423	<u>AATAAA</u>	AAC	ATA	AAA	AGG	CAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	A							465

图 5 卵巢脂肪酸结合蛋白基因 cDNA 和蛋白质序列

Fig.5 cDNA and amino acid sequence of fatty acid binding protein from ovary

图6 脂肪酸结合蛋白同源性和进化树

Fig.6 Sequence analysis and the phylogenetic tree of fatty acid binding protein

参考文献:

- [1] HEEMSTRA P C, RANDALL J E. Groupers of the world, fao species catalogue[J]. FIR/S125, 1993, 16: 130 - 132.
- [2] 刘付永忠, 王云新, 黄国光, 等. 斜带石斑鱼亲鱼强化培育及自然产卵研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(6): 81 - 85.
- [3] 韩新燕, 汪以真, 许梓荣. 脂肪酸结合蛋白的研究进展[J]. 生物学通报, 2000, 35: 7 - 9.
- [4] OCKNER R K. Historic overview of studies on fatty acid-binding proteins[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1990, 98: 3 - 9.
- [5] EILEEN M D W, PIERCE M, WRIGHT J M, et al. Nucleotide sequence of cDNA clones coding for a brain-type fatty acid binding protein and its tissues-specific expression in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Biochim et Biophysica Acta, 2000, 1492 (1): 227 - 232.
- [6] ANDO S, XUE X H, TIBBITS G F, et al. Cloning and sequencing of complementary DNA for fatty acid binding protein from rainbow trout heart[J]. Comp Biochem Physiol, 1998, al. Amino acid sequence, binding properties and evolutionary relationships of the basic liver fatty-acid-binding protein from the catfish *Rhamdia sapo* [J]. Eur J Biochem, 1997, 249: 510 - 517.
- [8] MEDZIHRADSKY K F, GIBSON B W, KAUR S, et al. The primary structure of fatty-acid-binding protein from nurse shark liver, Structural and evolutionary relationship to the mammalian fatty-acid-binding protein family[J]. Eur J Biochem, 1992, 203: 327 - 339.
- [9] SAMBROOK J, FRITSH E F, MANIATIS T, et al. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 127 - 128, 448.
- [10] 钟肖芬, 卫剑文, 赵贵军, 等. 平颏海蛇毒腺 cDNA 表达文库的构建[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2001, 40(3): 66 - 69.
- [11] NEMECZ G, ASEM E K. Evidence for the presence of fatty acid binding protein in avian granulose cells[J]. Acta Endocrinol, 1993 128(2): 178 - 83.

Construction of cDNA Library from the Ovary of *Epinephelus coioides* and Cloning of a Fatty Acid Binding Protein (FABP)

ZHANG Yong, ZHANG Wei-min, LI Xin, TIAN Jing, LIN Hao-ran

(Institute of Aquatic Economic Animals // Guangdong Provincial Key Laboratory for Aquatic Economic Animal,
Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: A cDNA library from the ovary of *Epinephelus coioides* was constructed using the SMART™ technique. The titer of the primary library was 4.5×10^6 pfu/mL; the recombination rate was 99%; and the titer of the amplified library was 1.2×10^{10} pfu/mL. After conversion of phagemid to plasmid, the positive clones were selected randomly and sequenced, and results showed that the sizes of the inserts were from 500 bp to 3 kb. After bioinformatic analysis, a clone of fatty acid binding protein gene was obtained, and it shared highest homology (70%) with human liver-type (L) fatty acid binding protein gene (L-FABP).

Key words: *Epinephelus coioides*; cDNA library; fatty acid binding protein