

黏质沙雷氏菌诱导的黄喉拟水龟 SMART cDNA 文库构建及相关基因的鉴定

赵密^{1,2} 朱新平^{1,2} 史燕¹ 高明英^{1,2}

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 200090

摘要 以致病黏质沙雷氏菌人工感染的黄喉拟水龟肝组织为材料,应用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术,构建了黄喉拟水龟的全长 cDNA 文库。首先用 SMARTTM PCR cDNA synthesis kit 合成全长的双链 cDNA,通过琼脂糖凝胶分级分离技术切除小片段的 cDNA,将大于 500 bp 的 cDNA 连接到 pGEM-T 载体中,电转化到 JM109 感受态细胞。在构建好的文库中,经测定,文库约含有 1.8×10^5 个重组子,重组效率达 90%,插入片段多在 0.5~3.0 kb 之间。对库中长度约为 1 000 bp 的 80 个基因进行了测序,结果显示大部分首次在龟类发现。测序鉴定的基因包括免疫相关基因 9 个、信号传导基因 6 个、催化酶类基因 8 个、糖代谢相关基因 2 个、转运相关基因 1 个、结构基因 2 个。

关键词 黄喉拟水龟; 黏质沙雷氏菌; SMART 全长 cDNA 文库; 基因鉴定

中图分类号 Q 78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)01-0099-06

黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*), 俗称石龟、香乌龟, 隶属龟鳖目 (Testudines)、龟科 (Emydidae)、拟水龟属 (*Mauremys*), 具有较高的食用、药用及观赏价值, 但其资源量有限^[1], 繁殖力较低, 在广东省被列为受保护的水生动物。近年, 黄喉拟水龟人工繁殖及饲养已获成功^[2-3], 并显示出良好的经济前景, 成为新的水产养殖品种。但随着人工养殖规模的扩大和养殖密度的提高, 龟类病害发生率越来越高, 其中体表溃疡病较为普遍, 谭爱萍等^[4] 从致病的黄喉拟水龟分离到条件致病菌黏质沙雷氏菌。

在养殖过程中, 龟类病害应以防为主, 增强龟的抗病能力是首选措施, 因此与免疫相关的研究就显得非常重要。截至目前, 与黄喉拟水龟免疫相关基因的研究仍未见报道, 本试验用病原菌黏质沙雷氏菌攻毒黄喉拟水龟, 然后提取其肝脏总 RNA, 构建其 SMART cDNA 文库, 以期筛选出免疫相关基因, 为研究黄喉拟水龟抗菌相关基因的表达调控和抗病机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

黄喉拟水龟取自珠江水产研究所龟类繁育基

地, 健康无病, 体质量 120~160 g。暂养 1 周进行试验。黏质沙雷氏菌, 由珠江水产研究所谭爱萍助理研究员提供; SMARTTM PCR cDNA synthesis kit, 购自 Clontech 公司; 总 RNA 提取试剂 TrizolTM Reagent, 购自 Invitrogen 公司; PowerscriptTM 反转录酶、大肠杆菌 JM109 电感受态细胞, 购自大连宝生物公司; pGEM-T 载体购自上海生物工程公司。

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。

1.2 细菌复壮及人工感染

黏质沙雷氏菌株接种于 LB 平板 37 °C 培养 20 h, 从中挑出单菌落, 在 LB 液体培养基中扩大培养, 让浓度达到 1.5×10^8 cfu/mL, 取 200 μ L 菌液腹腔注射高体革鲂 (*Scortum barcoo*), 从濒死的高体革鲂肝内分离细菌, 划线接种于 LB 平板进行培养, 挑取形态一致的优势单菌落。进行 PCR 检测, 挑取阳性菌落, 扩大培养, 以每只 1×10^{12} cfu 的剂量腹腔注射感染试验组黄喉拟水龟, 对照组同法注射灭菌生理盐水。

1.3 总 RNA 的提取

试验组黄喉拟水龟在感染后第 3 天开始反应迟钝, 第 5 天开始死亡。解剖其中 1 只濒死的黄喉拟

收稿日期: 2010-04-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2004CB117401)、广东省科技兴渔项目 (B200701A06)

赵密, 上海海洋大学硕士研究生, 研究方向: 水产种质资源与遗传育种。E-mail: mi1225zhao@126.com

通讯作者: 朱新平, 博士, 研究员, 研究方向: 水产动物种质资源与遗传育种。E-mail: zhuxinping_1964@yahoo.com.cn

水龟,按 Trizol 试剂操作说明书提取其肝脏总 RNA,最后将总 RNA 沉淀溶于去除 RNA 酶的去离子水中。

1.4 单链和双链 cDNA 的合成

1)单链 cDNA 的合成。取 0.5 μg 纯化的 mRNA,加入 1 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ CDS III/3' PCR 引物和 10 $\mu\text{mol/L}$ SMART III 寡核苷酸,反应体积为 5 μL ,于 PCR 仪上 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,冷却后加入 PowerscriptTM 逆转录酶,1 μL 浓度为 10 mmol/L dNTP 混合液,20 mmol/L DTT 及 5 \times 第 1 链合成缓冲液 2 μL ,使总反应体积达 10 μL ,于 PCR 仪上 42 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h,逆转录合成 cDNA 第 1 链。

2)双链 cDNA 的合成。取 cDNA 第 1 链 2 μL ,分别加入 2 μL 浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ CDS II/3' PCR 引物和 5' PCR 引物,加入 50 \times Advantage 2 聚合酶混合液和 50 \times dNTP 混合液各 2 μL ,10 \times 第 2 链合成缓冲液 10 μL ,反应体积为 100 μL 。于 PCR 仪上用 LD PCR 方法 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s 后,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,68 $^{\circ}\text{C}$ 复性延伸 6 min 进行 15 和 18 个循环以扩增双链 cDNA。

1.5 cDNA 大片的分离与回收

经过 1 \times TBE 琼脂糖凝胶电泳检测,18 循环的双链 cDNA 达到要求。将 50 μL 的 18 循环的双链 cDNA 产物进行切胶回收,切取 500 bp 以上的片段,按照 Qiagen 琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。

1.6 cDNA 的连接

将 500 bp 以上的大片段 cDNA 与 pGEM-T 载体连接。反应体系为 5 μL 2 \times Buffer + 2 μL 载体 + 2 μL cDNA + 1 μL T₄ ligation。4 $^{\circ}\text{C}$ 反应过夜。

1.7 连接产物电转化

操作如下:从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出感受态细胞 JM109,置于冰上解冻后,迅速加到连接产物中,混匀,转移至已预冷的 0.2 cm 电极杯中,在 2 000 V 电压下电转化,脉冲时间为 4.6 s。电击后,迅速用 0.9 mL SOC 培养基洗出转化产物,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 经 225 r/min,摇菌复苏 1 h。

1.8 cDNA 文库的容量和重组率测定

1)原始文库容量:在总体积为 100 μL 的回收纯化的 cDNA 中取出 2 μL 与 pGEM-T 载体连接,体系为 10 μL ,取 2 μL 稀释的连接产物转化 50 μL 大肠杆菌 JM109 电转感受态细胞,复苏后体积为 1 mL,涂板 10 个。以平均每板所长出的菌落数来计算库容。

2)电转化后产物加 IPTG 4 $\mu\text{L}/\text{mL}$,X-gal 40

μL 。通过蓝白斑数量计算文库的重组率。

重组率计算:重组率=(白斑的个数/菌斑总数) \times 100%

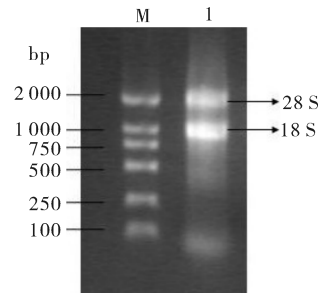
1.9 DNA 测序和序列分析

随机选取经过菌落 PCR 鉴定确认有重组质粒插入并且长度 \geq 1 000 bp 的菌落,过夜培养后送上海生工生物工程有限公司测序,在 NCBI 上利用 BlastX 程序对测得的 DNA 序列进行比对,并对比对的结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 黄喉拟水龟总 RNA

从电泳结果看,用 Trizol 试剂抽提的总 RNA 中,1 \times TBE 琼脂糖凝胶电泳检测 mRNA 质量,18S、28S rRNA 条带清晰(图 1)。测得 $D_{260}/D_{280} = 1.905$,说明总 RNA 的纯度达到要求。



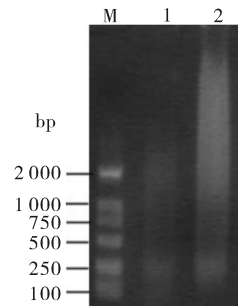
M. DNA marker (DL 2 000); 1. 沙雷氏菌诱导黄喉拟水龟的总 RNA The total RNA of the Asian yellow pond turtle stimulated with the *Serratia marcescens*.

图 1 总 RNA 电泳分析

Fig. 1 Analysis of the total RNA

2.2 cDNA 的合成

取 5 μL LD-PCR 合成产物在 1.1% TBE 琼脂糖凝胶上进行电泳分析,结果在 0.3~7.0 kb 有弥散的条带(图 2),这符合试剂盒说明书所述,说明



M. DNA marker(DL 2 000); 1. 15 个循环的双链 cDNA cDNA of 15 cycles; 2. 18 个循环的双链 cDNA cDNA of 18 cycles.

图 2 双链 cDNA 1.1% 琼脂糖电泳分析

Fig. 2 Analysis of ds cDNA synthesized by 1.1% agarose gel electrophoresis

cDNA 已被成功合成。

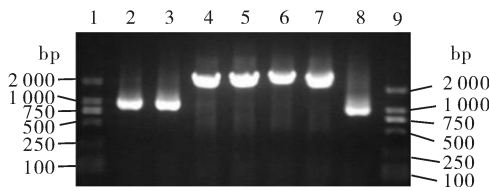
2.3 cDNA 文库的库容及重组率

按照本文“1.8”方法所涂布平板上平均长出 73 个单菌落,由此推算出文库容量为 $73 \times 10 \times 5 \times 50 = 1.825 \times 10^5$ 个克隆。

10 个板共长出 730 个克隆,其中蓝斑 69 个,则重组率为 90%。

2.4 插入片段长度分析

将 730 个克隆,以载体特异的 5' 测序引物和 T 启动子引物进行 PCR 扩增,插入片段大小为 0.5~3.0 kb(图 3),而且多数大于 1.0 kb。



1,9. DNA marker (DL 2 000); 2~8. 随机的 cDNA 文库插入片段 PCR 扩增产物 PCR products of recombinant clones picked at random.

图 3 cDNA 文库重组子的菌液 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Analysis of PCR products of recombinant clones from the original cDNA library by agarose gel electrophoresis

2.5 文库基因测序和分析

对库中随机挑取的单菌落进行琼脂糖初步检测,将长度大约为 1 000 bp 的 80 个克隆进行了测序,再进行 Blast 比对分析,结果显示大部分基因在龟类首次发现。主要基因列表如表 1。测序鉴定的基因包括免疫相关基因 9 个:转铁蛋白基因,血浆铜蓝蛋白基因,补体 C3 基因,补体 C9 基因,血清蛋白基因,巨噬细胞炎症蛋白基因,血清淀粉样蛋白 A 基因, α -2 巨球蛋白基因和 VSIG4;信号传导基因 6 个:RAS 原癌基因,死亡相关蛋白基因,血管紧张素原基因,HIG1 家族基因,锌指蛋白基因和 DAB2 抗体基因;催化酶类基因 8 个:酰基辅酶 A 合成酶基因,酪氨酸转氨酶基因,乙醛脱氢酶基因,氨基乙酸半醛合成酶基因,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶基因,赖氨酸羟化酶基因,金属基质蛋白酶 3 基因和金属基质蛋白酶 23 基因;代谢相关基因 2 个:细胞色素 b 基因和细胞色素 P450 3A 基因;转运相关基因 1 个:可溶性载体家族基因;结构基因 2 个:微管蛋白基因和肌动蛋白基因。

3 讨 论

在感染、炎症、组织损伤等应激原作用于机体后的短时间(数小时至数日)内,会发生急性期反应:血清成分会发生某些变化。参与急性期反应的物质大多数是蛋白质,称为急性期蛋白,大多数为肝脏产生。急性反应蛋白有抑制蛋白酶的作用,可防止机体组织损害、清除异物和坏死组织、清除自由基、促进损伤细胞修复^[5]。血清淀粉样蛋白 A,补体 C3,补体 C9,转铁蛋白,铜蓝蛋白, α -2 巨球蛋白,血清蛋白均属于急性反应蛋白。Merchant 等^[6]发现鳄鱼的补体系统能有效杀灭细菌,进一步证明了补体在爬行动物中的免疫作用。

金属基质蛋白酶 3 和金属基质蛋白酶 23,同属金属基质蛋白酶家族,是一类分解细胞外基质组分的锌蛋白酶,炎症反应时期在人体组织各处均可见其成员存在。当机体为了抵抗外界抗原的刺激,巨噬细胞释放 IL-1 等细胞因子,IL-1 的增加可诱导动物体内金属硫蛋白表达增加^[7]。MMPs 家族在炎症反应中广泛地调节物理屏障,调制炎症细胞因子和趋化因子活动,以调整白细胞向感染或损伤地方活动^[8]。在 MMP3 缺乏的小鼠中,肠粘膜内 CD4⁺淋巴细胞减少^[9];巨噬细胞产生的趋化因子活动减少^[10];用 LPS 诱导的神经炎症中,中性粒细胞减少^[11]等。

巨噬细胞炎症蛋白,属于 CC 趋化因子,对各种革兰氏阴、阳性菌均有抗菌效果。Yang 等^[12]通过分析巨噬细胞炎症蛋白的结构,发现其拓扑表面聚集了很多带正电荷的残基,而此结构对防御素抗菌活动起到重大作用。

颗粒酶 B 是一组同源性的丝氨酸蛋白酶,广泛存在于杀伤性 T 淋巴细胞、自然杀伤细胞和肝脏中的 Kupffer 细胞等各种杀伤细胞的胞浆颗粒中^[13],可导致细胞凋亡。CD8⁺杀伤性 T 淋巴细胞几乎完全依赖穿孔素和颗粒酶杀伤靶细胞和病原体^[14]。

人 VSIG4 由 Langnaese 等^[15]最早发现,是巨噬细胞上的补体受体,可结合补体 C3 的降解片段 C3b 和 iC3b,对于病原体的吞噬起重要作用^[16-18]。近来 Vogt 等^[19]发现 VSIG4 还是一种新的 B7 家族相关分子,并且证实了 VSIG4 有抑制 T 细胞活化的作用。

表 1 通过 BlastX 比对鉴定的基因

Table 1 Putative genes identified in cDNA clones through BlastX search of the NCBI databases

基因 Category clone	相似物种 BlastX targeted gene	同源蛋白登录号 GenBank accession	E 值 E value	同源性/% Identity	出现次数 Frequency in library
免疫相关的基因 Immune-related					
转铁蛋白 Transferrin	红耳龟 <i>Chrysemys scripta elegans</i>	emb CAH10346.1	0.0	91	21
铜蓝蛋白 Ceruloplasmin	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_001235149.1	0.0	74	2
补体 C3 Complement component 3	鸭嘴兽 <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	ref XP_001505969.1	0.0	59	3
补体 C9 Complement component 9	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002193012.1	0.0	68	1
血清蛋白 Serum albumin	新西兰大蜥蜴 <i>Sphenodon punctatus</i>	gb AAM46104.1 AF375971_1	0.0	59	4
巨噬细胞炎症蛋白 Macrophage inflammatory protein	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref NP_989769.1	2e-24	75	1
血清淀粉样蛋白 A Serumamyloid A	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002198615.1	1e-41	67	1
α -2 巨球蛋白 Alpha-2-macroglobulin	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_416476.2	0.0	74	1
VSIG4 V-set and immunoglobulin domain containing 4	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_420167.1	8e-60	61	1
信号传导基因 Cell signaling					
RAS 癌基因家族 Member RAS oncogene family (RAB7A)					
死亡相关蛋白 Death-associated protein	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref NP_001026174.1	1e-46	88	1
血管紧张素原 Angiotensinogen	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_419584.1	2e-133	54	1
HIG1 域家族 HIG1 domain family	鸭嘴兽 <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	ref XP_001513449.1	7e-25	69	1
锌指蛋白 Zinc finger	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_416615.2	7e-119	88	1
DAB2 抗体 Disabled homolog 2 mitogen-responsive phosphoprotein	鸭嘴兽 <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	ref XP_001507342.1	3e-49	63	1
催化酶类基因 Catalytic activity					
酰基辅酶 A 合成 酶长链家族成员 1 Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	马 <i>Equus caballus</i>	ref XP_001491142.2	3e-134	79	5
酪氨酸转氨酶 Tyrosine aminotransferase	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002197132.1	0.0	82	2
乙醛脱氢酶 Aldehyde dehydrogenase	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002189365.1	0.0	88	1
氨基乙酸半醛合成酶 Aminoacipate-semialdehyde synthase	马 <i>Equus caballus</i>	ref XP_001502225.1	0.0	64	1

续表 1 Continued from Table 1

基因 Category clone	相似物种 BlastX targeted gene	同源蛋白登录号 GenBank accession	E 值 E value	同源性/% Identity	出现次数 Frequency in library
还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 NADPH oxidase	家犬 <i>Canis familiaris</i>	ref XP_549136.2	7e-172	70	1
颗粒酶 B Granzyme B	旱獭 <i>Marmota monax</i>	gb AAP80579.1	1e-10	60	1
金属基质蛋白酶 23 Matrix metalloproteinase 23	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002197777.1	7e-40	66	3
金属基质蛋白酶 3 Matrix metalloproteinase 3	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002198018.1	8e-154	63	1
代谢相关基因 Metabolic					
细胞色素 b Cytochrome b	台湾棘鲷 <i>Acanthopagrus taiwanensis</i>	emb CAQ16421.1	9e-10	31	1
细胞色素 P450 3A Cytochrome P450 3A	密西西比短吻鳄 <i>Alligator mississippiensis</i>	dbj BAE95685.1	1e-134	66	1
转运相关基因 Transport metabolism					
可溶性载体家族 26 成员 5 Solute carrier family 26	珍珠鸟 <i>Taeniopygia guttata</i>	ref XP_002188389.1	0.0	78	1
结构基因 Cell structure and growth					
微管蛋白 Delta-tubulin	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref XP_415881.1	1e-125	78	1
肌动蛋白 Actin, gamma 1	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	ref NP_001007825.1	0.0	91	2
未知功能基因 Unknown function					
预测蛋白 Predicted protein	海葵 <i>Nematostella vectensis</i>	ref XP_001633469.1	1e-07	30	4
预测蛋白 Predicted protein	海葵 <i>Nematostella vectensis</i>	ref XP_001640187.1	5e-23	52	1

迄今关于爬行动物获得性免疫方面的直接证据基本没有。颗粒酶 B 基因和 VSIG4 基因的功能,均与 T 细胞有所联系。此 2 种基因的发现,有可能为进一步揭示爬行动物的获得性免疫提供思路。

参 考 文 献

[1] 赵尔宓. 中国濒危动物红皮书——两栖类和爬行类[M]. 北京: 科学出版社,1998:120-121.

[2] 朱新平,陈永乐,魏成清,等. 黄喉拟水龟的繁殖生物学研究[J]. 水生生物学报,2001,25(4):454-460.

[3] 朱新平,陈永乐,魏成清,等. 人工饲养对黄喉拟水龟繁殖力的影响[J]. 中国水产科学,2001,8(2):52-54.

[4] 谭爱萍,邹为民,姜兰,等. 黄喉拟水龟体表溃疡病原菌 SG24 的分类鉴定[J]. 广东海洋大学学报,2007,27(3):64-68.

[5] KUSHNER I, MACKIEWICZ A. Acute phase proteins; molecular biology, biochemistry, and clinical applications[M]. Boca Raton; CRC Press, 1993; 6-7.

[6] MERCHANT M, ROCHE C, THIBODEAUX D, et al. Identification of alternative pathway serum complement activity in

the blood of the American alligator (*alligator mississippiensis*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 141 (3): 281-288.

[7] 丁明星,王玉莲,朱惠玲,等. 免疫激活与抗菌药物调节研究进展[J]. 华中农业大学学报,2007,26(5):741-746.

[8] ANNE M, MANICONE A B, JOHN K, et al. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation[J]. Cell and Developmental Biology, 2008, 19: 34-41.

[9] LI C K, PENDER S L, PICKARD K M, et al. Impaired immunity to intestinal bacterial infection in stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3)-deficient mice[J]. Journal of Immunology, 2004, 173(8): 5171-5179.

[10] HARO H, CRAWFORD H C, FINGLETON B, et al. Matrix metalloproteinase-3-dependent generation of amacrophage chemoattractant in a model of herniated disc resorption[J]. Journal of Clinical Investigation, 2000, 105(2): 133-141.

[11] GURNEY K J, ESTRADA E Y, ROSENBERG G A. Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation[J]. Neurobiology of disease, 2006, 23(1): 87-96.

[12] YANG D, CHEN Q, DAVID M, et al. Many chemokines inclu-

- ding CCL20/MIP-3 display antimicrobial activity[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2003, 74: 448-455.
- [13] NORIKO K, MASAHIRO K, OSAMU H, et al. Expression of granulysin mRNA in the human megakaryoblastic leukemia cell line CMK[J]. *Acta Haematol*, 2002, 108: 13-16.
- [14] JULIE D Y, JIANG K, SHENG W, et al. A view to a kill: signals triggering cytotoxicity[J]. *Clinical Cancer Research*, 2002, 8: 636-642.
- [15] LANGNESE K, COLLEAUX L, KLOOS D U, et al. Cloning of Z39Ig, a novel gene with immunoglobulin-like domains located on human chromosome X[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492(2/3): 522-525.
- [16] HEHMY K Y, KATSCHKE K J J R, GORGANI N N, et al. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens[J]. *Cell*, 2006, 124(5): 915-927.
- [17] ZANG X, ALISON J P. To be or not to be B7[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(10): 2590-2593.
- [18] LEEM Y, KIM W J, KANGY J, et al. Z39Ig is expressed on macrophages and may mediate inflammatory reactions in arthritis and atherosclerosis[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, 80(4): 922-928.
- [19] VOGT L, SCHMITZ N, KURRER M O, et al. VSIG4, a B7 family-related protein, is a negative regulator of T cell activation[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(10): 2817-2826.

Construction of a smart cDNA library of Asian yellow pond turtle stimulated with *Serratia marcescens* and identification of related genes

ZHAO Mi^{1,2} ZHU Xin-ping^{1,2} SHI Yan¹ GAO Ming-ying^{1,2}

1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract To understand anti-infectious response to bacteria in the Asian yellow pond turtle (*Mauremys mutica*), a full length cDNA library was constructed for it by SMART technique experimentally infected with *Serratia marcescens*. Firstly, the double-strand cDNA was synthesized using SMARTTM PCR cDNA synthesis kit. Second, the ds cDNA was separated into two parts based on the size distribution of amplified ds cDNA by agarose gel size fractionation. The part shorter than 500 bp was discarded and the other one longer than 500 bp was ligated to the pGEM-T vector. The ligation mixture was transformed into *E. coli* JM109 by electroporation. The cDNA library contained 1.8×10^5 independent clones with DNA inserts of 0.5-3.0 kb. The recombination rate was 90.3%. We sequenced 80 cDNA clones about 1 kb and most of the genes were found the first time in reptiles. We classified these clones in functions with 9 in immunity, 6 in cell signaling, 8 in catalytic activity, 2 in sugar/glycolysis metabolism, 1 in transport metabolism, and 2 in cell structure. The successfully constructed cDNA library will be essential for rapid isolation of differentially expressed genes related to *Serratia marcescens* infection and useful for understanding the anti-infectious molecular mechanism in the Asian yellow pond turtle.

Key words Asian yellow pond turtle; *Serratia marcescens*; SMART cDNA library; gene identification

(责任编辑:边书京)