

## 大鲵皮肤 cDNA 文库 ESTs 分析及 *Dynll 2* 基因的分离与表达

王立新<sup>1,2\*</sup>, 郑尧<sup>1,2</sup>, 李锋刚<sup>1,2</sup>, 李雯娟<sup>1</sup>, 刘小林<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 以本实验室构建的大鲵皮肤 cDNA 文库为材料, 通过文库质量检测、随机测序、ESTs 拼接、COG 软件进行基因注释等对文库进行了分析, 并从中分离获得了大鲵胞质动力蛋白轻链 2 (dynein light chain, LC8-type 2, *Dynll 2*) 基因的 cDNA 序列, 对 *Dynll 2* 基因进行了生物信息学分析及组织表达研究。结果表明, 本实验室构建的大鲵 cDNA 文库初级库容为  $1.50 \times 10^6$  cfu, 文库重组率为 94.8%, 插入片段平均长度约为 1 kb。400 个随机克隆测序共获得 343 个有效 ESTs, 其中 214 条 ESTs 序列 *E*-值  $< 10^{-6}$ , 经 COG 软件归为 9 大类, 其中与分泌蛋白、细胞代谢、细胞骨架以及信号转导相关的基因表达量最高, 分别为 31.3%、14.0%、13.0% 和 12.6%。表明大鲵皮肤分泌活动强烈, 代谢旺盛, 这和大鲵皮肤发挥免疫、呼吸以及渗透压平衡等生理功能相一致。获得的大鲵 *Dynll 2* 基因全长为 682 bp, 其中 5'-UTR 为 57 bp, 3'-UTR 为 313 bp, 生物信息学分析表明, 该基因编码 104 个氨基酸, 分子量为 12.03 ku, 等电点 *pI* 值为 7.05。Dynll 2 蛋白在 88~104 处有由里向外和由外向里的 2 个跨膜螺旋区, 且二级结构以  $\alpha$ -螺旋为主; 在 69~87 处有典型的“ZnF-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>”结构模体; 经比较, 其三级结构与鼠 Dynll 2 蛋白相似。Dynll 2 蛋白的进化分析表明, 大鲵与无尾两栖类相比, 更接近陆生动物。荧光定量实验表明, 大鲵 *Dynll 2* 基因在肌肉中高表达, 在其他组织中低度表达。

**关键词:** 大鲵; 皮肤 cDNA 文库; *Dynll 2* 基因; 组织表达; 进化关系

**中图分类号:** Q 781; Q 786; S 917

**文献标志码:** A

中国大鲵 (*Andrias davidianus* Blanchard) 俗称娃娃鱼, 属两栖纲、有尾目、隐鳃鲵科, 是我国特有的大型珍稀两栖动物。因具有极高的经济价值而遭过度捕杀, 目前已面临灭绝的危险。然而大鲵作为两栖动物, 其皮肤分泌物丰富, 含有大量的生物活性物质, 是未来可供人类利用的基因资源宝库。加之其进化地位独特, 因而是非常重要的生物资源。故如何在资源面临衰竭的情况下有效保护和发掘其资源价值, 已经是研究大鲵的迫切问题。cDNA 文库构建不仅可以作为发现、获得新基因的重要手段之一<sup>[1]</sup>, 同时也是物种保护保存濒危野生动物种质资源的最为有效的方法之一。

大鲵胞质动力蛋白轻链基因是大鲵皮肤 cDNA

文库随机测序获得的全长基因家族, 属于动力蛋白 (dynein) 基因家族, 关于 dynein 的功能有诸多报道, 主要集中在微管运输, 作为接头蛋白, 参与细胞转移和在一些疾病中发挥作用等<sup>[2]</sup>。目前已发现 2 种胞质机动重链蛋白 (heavy chain: DYNC1H1, DYNC2H1)、2 种中链蛋白 (intermediate chain: DYNC1I1, 2)、3 种轻中链蛋白 (light D intermediate chain: YNC1L1, 2; DYNC2L1) 以及 6 种轻链蛋白 (light chain: DYNLL1, 2; DYNLRB1, 2; DYNLTI, 3)<sup>[3]</sup>。胞质动力蛋白轻链 2 (dynein light chain, LC8-type 2, *Dynll 2*) 除了发挥胞质或 Dynein 复合体的功能<sup>[4]</sup>, 还能与 MYO5A (Myosin-Va)<sup>[3]</sup>、BMF (Bcl-2-modifying factor)<sup>[5-6]</sup>、桥尾蛋白 (Gephyrin)<sup>[7]</sup> 相互作用, 主要起马达蛋白的作用。胞质动力轻链蛋白

收稿日期: 2011-01-12 修回日期: 2011-03-10

资助项目: 陕西省自然科学基金项目 (2003C124); 西北农林科技大学重点项目 (01140513)

通讯作者: 王立新, E-mail: fisherwanglx@163.com

中 *Dynll 1*、*Dynll 2* 两个基因在体内表达具有组织特异性<sup>[8]</sup>,但目前两栖类中 *Dynll 2* 基因的报道较少。

目前,有关大鲵的研究主要集中在大鲵繁殖、生长发育<sup>[9]</sup>、营养<sup>[10-11]</sup>、病害及生理<sup>[12-14]</sup>、生态<sup>[15]</sup>和遗传学<sup>[16-18]</sup>等方面,而针对大鲵生物活性物质及其基因资源的研究也较少见。为此,本研究对已构建的大鲵皮肤 cDNA 文库进行了深入分析,并对获得的大鲵胞质动力蛋白轻链基因进行了生物信息学分析和组织表达研究,以期为大鲵资源保护和皮肤生物活性成分开发,以及大鲵皮肤免疫抗病、生理代谢的机制研究奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

大鲵皮肤 cDNA 文库为本实验室构建并保存<sup>[19]</sup>。健康的 3 尾 3 龄以上大鲵购自陕西汉中天利大鲵养殖场,体长(62.25 ± 5.74) cm,体重(1 979.67 ± 321.54) g。无菌条件下取大鲵肝脏、皮肤、肌肉、肠、肺、胃 6 种组织的样品,用锡箔纸包好 -80 °C 保存。PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒、SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time, DRR041A)、氨苄青霉素(Ampicillin)、IPTG、X-gal、DL2000 DNA Marker 均购自 TaKaRa,其它常规试剂均为国产分析纯。

### 1.2 单克隆挑取、测序

取 10 μL 文库菌液,稀释 1 000 倍后,取 50 μL 涂布于 13 cm 培养皿(Apr-IPTG/ X-gal LB 固体培养基)上,37 °C 培养过夜,计数各 LB 平板上的阳性克隆数,计算文库容量。采用常规 PCR 方法鉴定 32 个随机单克隆 cDNA 插入片段,并估计文库的重组率和插入片段大小。*β-actin* 引物由上海生工生物工程有限公司合成,上游引物为 5' GTTATGCCCTG CCTC ACG 3'; 下游引物为:5' GCACAATTTCCC TTTCGG 3'(引物下同)。随机挑取 400 个单克隆分别置于 3 mL 含氨苄浓度为 100 μg/mL 的 LB 液体培养基中扩大培养 12 h 后,菌液送宝生物(大连)公司采用 ABI3730 DNA Sequence DNA (Applied Biosystems) 自动序列仪进行序列测定(M13-47 方向,5'-CGCCAGGGTTTTCC CAGTCACGAC-3')。计算空载体序列数目,则 cDNA 文库重组率(%) = PCR 重组克隆数/总克隆数 × 100。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<sup>-06</sup> 或

相似性 > 50%<sup>[20]</sup> 时,判定为同源序列。同时将获得的 ESTs 使用 Cross-match 软件去掉 ESTs 中的低质量序列、载体序列、重复序列等。使用 Phrap 序列拼接软件将测序得到的 ESTs 拼接成重叠群,将拼接得到的重叠群和单拷贝 ESTs 与 GenBank 非冗余蛋白库比对并使用同源基因簇归类法(clusters of orthologous genes, COG)做功能注释。

### 1.3 *Dynll 2* 基因 cDNA 序列分析

采用 NCBI-BLAST 进行 *Dynll 2* 基因注释,蛋白质性质采用 ScanSite pI/Mw 软件分析,采用 SingalP 3.0、ProtScale 软件、TMHMM 软件分别进行信号肽查找、疏水结构和跨膜结构预测,SMART 软件进行蛋白质特征模体检测,Tmpred 软件进行跨膜螺旋预测,采用 SOPMA 软件进行二级结构在线预测,Phyre 软件进行验证,采用 Swiss-model 软件进行三级结构预测,Swiss-Pdb Viewer 软件<sup>[21]</sup> 查看蛋白模型。下载鸭嘴兽(*Ornithorhynchus anatinus*)等 26 个陆生动物和水生生物的 *Dynll 2* 氨基酸序列。多序列比对及进化树构建采用 MEGA 4.0 软件,系统进化树用 UPGMA 方法构建,空位视为信息缺失,同时采用 Bootstrap 1000 检验系统树各分支的置信度。

### 1.4 *Dynll 2* 基因组织表达

提取大鲵皮肤、肝、胃、肌肉、肠、肺 6 种组织的 RNA,采用 BestKeeper 软件筛选出 *β-actin* 作为内参基因,*Dynll 2* 基因上游引物为 5'-ACACACGAGACAAAGCACTTCATC-3'; 下游引物为 5'-CAGAGTCCAA G TTCCACGCAATCA-3',同时采用半定量和 SYBR GreenI 染料法实时定量检测 *Dynll 2* 基因的组织表达情况(Bio-Rad iQ5)。实时定量 PCR 反应按 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒进行,qRT-PCR 反应程序为 95 °C 3 min; 95 °C 10 s,60 °C 30 s,40 个循环;反应完成后进行溶解曲线分析,95 °C 变性 15 s,按 0.1 °C/s 的增速缓慢从 65 °C 升至 95 °C。使用 CFX Manager Software 采集数据,数据处理使用 SPSS Statistics V17.0 统计软件,每一轮计算均使用目的和内参基因的平均 ΔC<sub>t</sub>,按照 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算 C<sub>t</sub> 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鲵皮肤 cDNA 文库质量及 ESTs 分析

平板中共得到 385 个大鲵单克隆数,用平板计数法估算大鲵皮肤 cDNA 文库库容为 1.50 ×

$10^6$  cfu;采用 PCR 检测重组率为 100%;随机挑取单克隆获得的 343 ESTs,载体数量为 18 个,文库重组率为 94.8%;插入片断平均长度约为 1.0 kb,表明构建的大鲵皮肤 cDNA 文库质量较高。

聚类结果表明大鲵文库共代表 133 基因簇 (Unigenes),包括 91 个单个非冗余 ESTs (singletons,26.5%) 和 42 个克隆重叠群 (contigs,12.2%)。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,大鲵皮肤基因主要以低同源序列或无比对同源序列基因分布较多(表 1),线粒体基因比例也较大;169 条 ESTs (51.3%) 能够和 GenBank 中的已知基因相匹配(其中 9 条与大鲵基因同源)。根据基因功能对 214 条同源性较高的 ESTs 进行 COG 分类,分类结果见表 2。分泌蛋白基因、生命代谢相关基因、细胞骨架与结构形成和信号转导相关基因表达较丰富。

表 1 大鲵 cDNA 文库挑取克隆 343 个测序 ESTs 分析结果  
Tab.1 Characterization of 343 clones randomly isolated from skin cDNA library of *A. davidianus*

概述 characterization	克隆数(比例/%) no. of clones (percentage/%)
同源基因 known genes (E-value $<10^{-6}$ )	160(46.6)
大鲵基因 identical ESTs (E-value $<10^{-6}$ )	9(2.6)
低匹配 low hits to any database (E-value $<10^{-6}$ )	70(20.4)
无匹配 no hits to any database (E-value $<10^{-6}$ )	45(13.1)
线粒体基因 mitochondrial transcripts	27(7.9)
核糖体基因 ribosomal RNA transcripts	14(4.0)
载体 vector only	7(2.0)
空载体 empty vector	11(3.2)
合计 total	343(100)

表 2 ESTs COG 归类分析  
Tab.2 214 ESTs putative identifications categorized by COG method

基因功能 putative identifications	数量(比例/%) no. (percentage/%)
一般功能 general function prediction only	16(7.5)
生命代谢 metabolism	30(14.0)
细胞骨架 structure	28(13.0)
细胞周期调控 cell cycle control	5(2.3)
分泌 secretion	67(31.3)
蛋白质翻译后调控 protein posttranslational modification, turnover, chaperones	12(5.6)
基因重组及修复 genomic modifying	15(7.0)
信号传导 signal transduction mechanisms	27(12.6)
功能未知 function unknown	14(6.5)
合计 total	214(100)

## 2.2 大鲵 *Dynll 2* 基因的生物信息学分析

*Dynll 2* cDNA 及氨基酸序列分析 随机挑选编号为 ADS077 的克隆进行测序,序列总长 682 bp。经 BLAST 比对查询,该序列和鸡 (*Gallus gallus*) *Dynll 2* 基因的同源性为 82%,*E*-值为  $5e^{-125}$ ;编码的蛋白序列和人 (*Homo sapiens*) *Dynll 2* 蛋白的同源性为 86%,*E*-值为  $4e^{-50}$ ,被确定为 *Dynll 2* 基因。该基因包含 312 bp 的开放阅读框,5'-UTR 为 57 bp,3'-UTR 为 313 bp,ORF 区位于 58 ~ 369 处,编码 104 个氨基酸,符合完整的 cDNA 的特征(图 1)。大鲵 *Dynll 2* 基因核苷酸序列中“A/T”占 56.89%，“G/C”占 43.11%,属于 HATP 型。使用 ExPASy server 软件对该基因编码的氨基酸序列进行蛋白质基本性质推测分析,该蛋白质的理论分子量为 12 030.6 u,等电点 *pI* 值为 7.05。该氨基酸序列不稳定性指标 (instability index) 为 24.37,按分值 ( $<40$ ) 大小划分,*Dynll 2* 蛋白在水溶液中比较稳定。脂肪族氨基酸指数 (aliphatic index) 为 67.60,说明丙氨酸 (A)、缬氨酸 (V)、亮氨酸 (L) 和异亮氨酸 (I) 的含量很高,且 4 种氨基酸占氨基酸残基总数的 25.9%。编码蛋白中碱性氨基酸(赖氨酸、组氨酸、精氨酸)占 17.2%,酸性氨基酸(天冬氨酸、谷氨酸)占 10.5%。*Dynll 2* 在 69 ~ 87 处有典型的“ZnF-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>”结构模体,*E*-值为  $3.30 e^{-78}$ 。

*Dynll 2* 蛋白的二级与三级结构预测 SingalP 3.0 软件分析表明 *Dynll 2* 蛋白没有信号肽。Block Searcher 软件分析得知,该蛋白在 73 ~ 122 氨基酸处存在一个 Blocks。TMHMM 软件分析发现 *Dynll 2* 蛋白与其他物种 *Dynll 2* 蛋白一样具有细胞膜外在跨膜结构域;TmPred 软件分析发现 *Dynll 2* 蛋白在 88 ~ 104 处有由里向外和由外向里的 2 个跨膜螺旋区,与之前报道的鼠 (*Rattus norvegicus*) 的 *Dynll 2* 蛋白一致。ProtScale 软件分析该蛋白的疏水最大值为 2.311,疏水最小值为 -2.733,按分值大小 (Score  $>1.5$ ) 划分,其部分序列有强疏水性。SOPMA 软件预测 *Dynll 2* 蛋白含有 4 种二级结构:  $\alpha$ -螺旋结构 (Alpha helix, 50.96%)、无规卷曲结构 (Random coil, 19.23%)、延伸主链 (Extended strand, 24.04%) 和  $\beta$ -转角 (Beta turn, 5.77%),与 Phyre 软件预测的结果相一致。Swiss-model 软件预测此蛋白的三级结构与鼠的 *Dynll 2* 蛋白相似性达 100%,

与WANG等<sup>[22]</sup>报道的Dynll 2蛋白晶体结构一致,三级结构与其相似性为 $4.07 \times 10^{-45}$ 。

不同物种Dynll 2蛋白进化分析 采用MAGE4.0软件将大鲵Dynll 2氨基酸序列和不同进化阶元物种进行多重序列比对,聚类进化分析结果如图2。结果表明:大鲵Dynll 2氨基酸序列与鼠、人、苏门达腊猩猩、狗、大熊猫、鸭嘴兽的

Dynll 2蛋白同源性均为100%,与斑马鱼(98.9%)、大西洋鲑(98.9%)的同源性次之,均为大鲵第二位的“Thr<sup>2</sup>-Ser<sup>2</sup>”变异;与热带爪蟾、爪蟾、牛蛙的同源性分别为94.4%,92.1%,92.1%。大鲵Dynll 2与猪(89.2%)同源性最低,原因在于猪Dynll 2第19~22位多了4个残基“Gly-Glu-Met-Gly”结构。

```

1   cgaggacaagctcagctgctgccgaggagaagaaggttctgtagtggtgctgccgt
58   gtgaca ggc gag gca cag cgg gcg gag cac tgc cag agg ctc aca atg tct gac agg aag gct gtt atc
   V T G E A Q R A E H C Q R L T M S D R K A V I
137  aag aat gca gac atg tct gag gac atg cag caa gat gca gta gac tgt gcc aca cag gca atg gag aag tac
   K N A D M S E D M Q Q D A V D C A T Q A M E K Y
198  aac atc gag aag gac att gca gcc tac atc aag aag gaa ttt gac aag aag tac aat cca act tgg cac tgc
   N I E K D I A A Y I K K E F D K K Y N P T W H C
271  ata gtt gga aga aac ttt ggg agt tat gta aca cac gag aca aag cac ttc atc tat ttc tat ttg ggt caa gtt
   I V G R N F G S Y V T H E T K H F I Y F Y L G Q V
346  gcg att ctg ctc ttc aag tct gga tag gcgccgaggaattgctggaactggaactctgatcactgatggctgaagcccaga
   A I L L F K S G *
427  aaccctttgaaacgctgtgcagctgcactgtcaactatattaatgtgatgtaaattactgacttttttttgcattgttcctg
523  aaaagaaggcaac cttatgttcttctccttgggtgttcttctgttgcattgca ctgaaaaaagatgaaatgctcaaatggcc
616  ttaaatggtat gaaatgaaatttcactctgattgggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图1 Dynll 2基因的cDNA序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide of *Dynll 2* cDNA and deduced aa sequences from skin cDNA library of *A. davidianus*

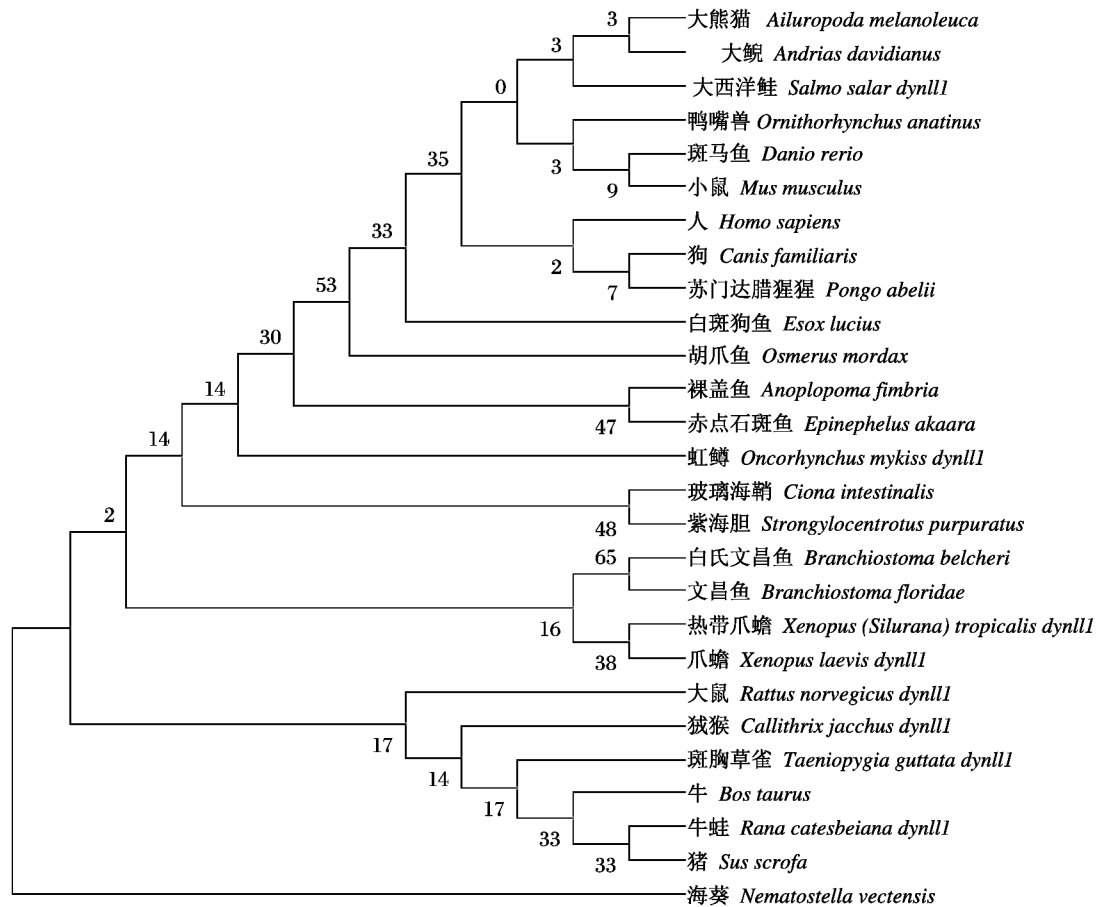


图2 大鲵与其他26种动物的Dynll 2蛋白亲缘关系分析

Fig. 2 Comparison of aa sequences of *Dynll 2* with other 26 animals by MAGE 4.0 software server

### 2.3 大鲵 *Dynll 2* 基因的组织表达

使用 *Dynll 2* 引物进行 PCR 检测,扩增得到 *Dynll 2* 基因产物长度为 103 bp。对 *Dynll 2* 基因在 6 种组织中表达的半定量结果进行分析,可知 *Dynll 2* 基因表达量从高到低依次是肠 > 肌肉 >

肝 > 肺 > 胃 > 皮肤。荧光定量结果显示,大鲵 *Dynll 2* 主要在肌肉中表达,肝、皮肤、肺、胃和肠组织表达量依次减少(图 3)。两种方法得到 *Dynll 2* 基因的组织表达情况基本一致。

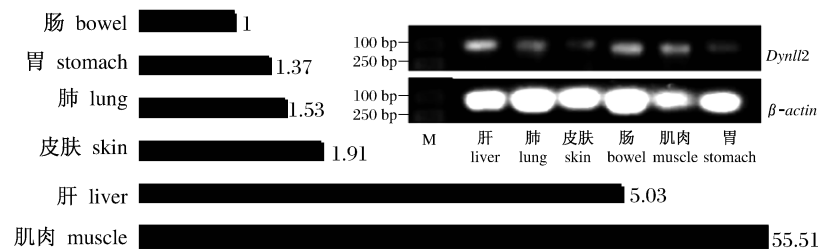


图 3 *Dynll 2* 基因的组织表达谱

Fig. 3 Comparison on *Dynll 2* mRNA in 6 tissues of *A. davidianus* by qRT-PCR

## 3 讨论

### 3.1 大鲵 cDNA 文库质量及 ESTs 分析

文库质量的评估主要有 3 个重要参数:库容、重组率及插入片段的大小。按照 cDNA 文库质量要求<sup>[23]</sup>,本研究构建的大鲵皮肤的 cDNA 文库完整性及有效性较好。对 cDNA 文库质量进行评估还需要综合考虑基因组 DNA 污染、线粒体基因、非重组率、微生物基因污染等参数,才能确定构建的文库是否符合高质量文库要求<sup>[24]</sup>。大鲵文库中空载体占总数的 2.0%,即非重组率仅为 2.0%,比大黄鱼(*Larimichthys crocea*, 5.57%)文库中低<sup>[25]</sup>;核糖体基因占 4.0%,其中部分基因与幼鲵生长密切相关<sup>[26]</sup>;线粒体基因占总数的 7.9%,高于鼠耳蜗(*R. norvegicus*, 6.54%) cDNA 文库<sup>[27]</sup>,但是大鲵线粒体相关基因的功能还不明确,需要进一步研究。大鲵文库中 Singletons (26.5%)虽比人软骨细胞文库(28.9%)<sup>[20]</sup>低,但比三刺鱼(*Gasterosteus aculeatus*, 23.3%)<sup>[28]</sup>、大西洋大比目鱼(*Hippoglossus hippoglossus*, 0.3%)<sup>[23]</sup>文库中的 Singletons 要高,且大鲵未知基因(13.1%)也要比比目鱼高(8.5%)<sup>[23]</sup>。综上,本研究构建的大鲵皮肤 cDNA 文库质量较高。

本研究 EST 序列分析归类还发现,大鲵皮肤中与分泌蛋白、细胞代谢、细胞骨架以及信号转导相关的基因表达量最高,分别为 31.3%、14.0%、13.0% 和 12.6%。众所周知,两栖动物皮肤参与细胞结构、呼吸代谢、渗透压平衡以及

免疫等诸多生命过程<sup>[29]</sup>,能分泌生物活性物质以便形成阻止捕食者的追杀和抑制微生物的生长的防御体系,其中以抗菌肽、激肽、神经毒素、防御素等类物质居多<sup>[29]</sup>。大鲵皮肤在受外界刺激时也能分泌大量白色浆液状分泌物。大鲵皮肤中分泌蛋白基因占最多,说明了大鲵皮肤可能含有多种免疫因子和生物活性物质,值得进一步深入研究。

### 3.2 大鲵 *Dynll 2* 基因进化分析

通过对不同动物 *Dynll 2* 的氨基酸序列对比发现,除了白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*)和猪(*S. scrofa*)分别出现了 4 个氨基酸残基的缺失和重复,其他物种氨基酸数目完全相同,说明 *Dynll 2* 在进化过程中具有极强的保守性。大鲵 *Dynll 2* 蛋白的聚类结果表明,大鲵与无尾两栖类相比,更接近陆生动物,进化程度更高。我们进一步比较大鲵 *Dynll 2* 与其他阶元物种氨基酸序列的同源性,发现大鲵 *Dynll 2* 与陆生动物同源性为 89.2% ~ 100%;与鱼类同源性为 89.9% ~ 98.9%;与无尾两栖类同源性为 92.1% ~ 94.4%,说明 4 类生物的进化顺序由低到高大致为“无尾两栖类→鱼类→大鲵→陆生动物”。从不同门类物种看,大鲵与斑马鱼(97.8%)、文昌鱼(*Branchiostoma floridae*, 95.5%)等鱼类的亲缘关系较紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*, 94.4%)、海葵(*Nematostella vectensis*, 91.0%)高,说明大鲵与鱼类的亲缘关系较棘皮动物和腔肠动物更近。

## 参考文献:

- [1] SIM G K, KAFATOS F C, JONES C W, *et al.* Use of a cDNA library for studies on evolution and developmental expression of the chorion multigene families[J]. *Cell*, 1979, 18(4): 1303-1316.
- [2] ZHANG J, LI S, MUSA S, *et al.* Dynein light intermediate chain in *Aspergillus nidulans* is essential for the interaction between heavy and intermediate chains[J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2009, 284(50): 34760-34768.
- [3] NAISBITT S, VALTSCHANOFF J, ALLISON D W, *et al.* Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein[J]. *J Neuroscience*, 2000, 20(12): 4524-4534.
- [4] PFISTER K K, FISHER E M, GIBBONS I R, *et al.* Cytoplasmic dynein nomenclature[J]. *Journal of Cell Biochemistry*, 2005, 171(3): 411-413.
- [5] DAY C L, PUTHALAKATH H, SKEA G, *et al.* Localization of dynein light chains 1 and 2 and their pro-apoptotic ligands [J]. *Biochemistry Journal*, 2004, 377(Pt3): 597-605.
- [6] PUTHALAKATH H, VILLUNGER A, O'REILLY L A, *et al.* Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis [J]. *Science*, 2001, 293(5536): 1829-1832.
- [7] FUHRMANN J C, KINS S, ROSTAING P, *et al.* Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes [J]. *J Neuroscience*, 2002, 22(13): 5393-5402.
- [8] SU A I, WILTSHIRE T, BATALOV S, *et al.* A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes [J]. *PNAS*, 2004, 101(16): 6062-6067.
- [9] 刘鉴毅, 谭永安, 谭启森, 等. 中国大鲵子二代适应能力及生长优势的研究[J]. *四川动物*, 2006, 25(2): 387-390.
- [10] 王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 中国大鲵皮肤营养成分分析[J]. *淡水渔业*, 2011, 41(2): 35-41.
- [11] 王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 中国大鲵肌肉、尾脂营养成分分析与评价[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2011, 49(2): 67-74.
- [12] 王高学, 白占涛, 张向前, 等. 大鲵赤皮病原分离鉴定及防治试验[J]. *西北农业大学学报*, 1999, 27(4): 71-74.
- [13] 乔志刚, 辛泽华, 李吉学, 等. 中国大鲵消化系统 13 种器官的蛋白水解酶种类和活性分析[J]. *动物学报*, 2003, 49(4): 537-539.
- [14] 杨楚彬, 罗凯坤, 周海燕, 等. 大鲵输卵管的基本组织结构及其发育变化[J]. *湖南师范大学学报: 自然科学版*, 2003, 26(1): 64-68.
- [15] 马勇, 马亦生, 巩会生, 等. 陕西太白山国家级自然保护区两栖爬行动物的初步调查[J]. *四川动物*, 2006, 25(2): 277-280.
- [16] ZHANG P, CHEN Y Q, LIU Y F, *et al.* The complete mitochondrial genome of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus* (Amphibia: Caudata) [J]. *Gene*, 2003, 311: 93-98.
- [17] 杨芳, 贺智敏, 詹显全, 等. 大鲵肝脏组织定向 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. *动物学报*, 2004, 50(3): 475-478.
- [18] YANG L P, MENG Z N, LIU Y, *et al.* Growth hormone and prolactin in *Andrias davidianus*: cDNA cloning, tissue distribution and phylogenetic analysis [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2010, 165(2): 177-180.
- [19] 王立新, 郑尧, 艾闽, 等. 大鲵皮肤 cDNA 文库构建及 *Arpc5l* 基因 cDNA 序列和组织表达分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2011, 27(3): 273-281.
- [20] KRAKOW D, SEBALD E T, POGUE R, *et al.* Analysis of clones from a human cartilage cDNA library provides insight into chondrocyte gene, expression and identifies novel candidate genes for the osteochondrodysplasias [J]. *Molecular Genetic Metabolism*, 2003, 79(1): 34-42.
- [21] SCHWEDE T, KOPP J, GUEX N, *et al.* SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server[J]. *Nucleic Acids Research*, 2003, 31(13): 3381-3385.
- [22] WANG W, LO K W H, KAN H M, *et al.* Structure of the monomeric 8 ku dynein light chain and mechanism of the domain-swapped dimer assembly [J]. *Journal of Biology Chemistry*, 2003, 278(42): 41491-41499.
- [23] DOUGLAS S E, KNICKLE L C, KIMBALL J, *et al.* Comprehensive EST analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), a commercially relevant aquaculture species [J]. *BMC Genomics*, 2007(8): 144.
- [24] 赵志辉, 李宁. EST 序列测定 cDNA 文库的构建和参数评估[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(4): 422-425.
- [25] ZHOU P, ZHANG Z P, WANG Y L, *et al.* EST analysis and identification of gonad-related genes

- from the normalized cDNA library of large yellow croaker, *Larimichthys crocea* [ J ]. Comparative Biochemistry and Physiology Part D, 2010 ( 5 ): 89 - 97.
- [26] SATO K, SUGITA T, KOBAYASHI K, *et al.* Localization of mitochondrial ribosomal RNA on the chromatoid bodies of marine planarian polyclad embryos [ J ]. Development Growth and Differentiation, 2001, 43(2) : 107 - 114.
- [27] PRIOR A S, REBILLARD M L, LENOIR M, *et al.* Identification of preferentially expressed cochlear genes by systematic sequencing of a rat cochlea cDNA library [ J ]. Molecular Brain Research, 1997, 47(1 - 2) : 1 - 10.
- [28] BROWN M M, WILLIAMS T D, CHIPMAN J K, *et al.* Construction of subtracted EST and normalised cDNA libraries from liver of chemical-exposed three-spined stickleback ( *Gasterosteus aculeatus* ) containing pollutant-responsive genes as a resource for transcriptome analysis [ J ]. Marine Environmental Research, 2008, 66(1) : 127 - 130.
- [29] 赖仞, 赵宇, 刘衡, 等. 两栖类动物皮肤活性物质的利用兼论中国两栖类资源开发的策略 [ J ]. 动物学研究, 2002, 23(1) : 65 - 70.

## Construction of cDNA library of *Andrias davidianus* skin tissue and molecular cloning and expression analysis of *Dynll 2* gene

WANG Li-xin<sup>1,2\*</sup>, ZHENG Yao<sup>1,2</sup>, LI Feng-gang<sup>1,2</sup>, LI Wen-juan<sup>1</sup>, LIU Xiao-lin<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

2. Shanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Dyneins are a group of evolutionarily highly conservative molecular proteins, which can be divided into two groups: cytoplasmic dyneins and axonemal dyneins. Cytoplasmic dynein probably moves along the microtubule essential for transporting cargo in eukaryotes. It is also probably involved in the movement of chromosomes and positioning the mitotic spindles for cell division. Dynein light chain 2, cytoplasmic, is a protein that in humans is encoded by the *Dynll 2* gene. To clone dynein light chain, LC8-type 2 (*Dynll 2*) gene from *A. davidianus*, and to analyze the characteristics of the functional gene by bioinformatics analysis, the structure of *Dynll 2* gene was isolated from skin cDNA library. A cDNA library of the skin tissue was constructed by using the isolated mRNA as the template during reverse transcription. The skin cDNA library of *A. davidianus* were detected and sequenced by picking clones randomly. It was confirmed that the titer of the skin cDNA library of *A. davidianus* was  $1.50 \times 10^6$  cfu, the recombination rate was 94.8%, and the PCR results showed that the average size of inserts segment was about 1 000 bp. A total of 343 ESTs from the library were sequenced and made alignment with sequences in GenBank database. Moreover, at least 214 clones ( $E$ -value  $< 10^{-6}$ ) derived from these identified clones were categorized into nine categories. Immune-related genes accounted for 31.3% of the largest distribution, metabolism genes (14.0%), cytoskeleton genes (13.0%) and signaling pathway-related genes (12.6%) took up a larger gene distribution though. It revealed that skin of *A. davidianus* made intense activities in the form of secretions and took part in metabolism reactions, according to their physiology function in the area of immunity, breathing, and osmotic pressure equilibrium. In order to investigate the contribution of *Dynll 2* to motor protein in *A. davidianus*, molecular cloning, analyzing cDNA sequence and expression analysis of *Dynll 2* gene from *A. davidianus* were performed. The relative mRNA expression levels of *Dynll 2* gene were investigated in *A. davidianus* using real-time RT-PCR. The *Dynll 2* cDNA contained a 682 nt of continuous complete open reading frame encoding a polypeptide of 104 amino acids with a calculated molecular mass of 12.03 ku. Analytic results of TMHMM, Phyre, ProtScale and SMART showed that *Dynll 2* localized to membrane. *Dynll 2* contained conserved "ZnF-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>" motif of Dynein family. *Dynll 2* shared high amino acid sequence identity with other organisms and the tertiary structure of the *Dynll 2* of *A. davidianus* was highly homologous to the one of *Rattus norvegicus*. Then phylogenesis analysis of *Dynll 2* was obtained with other 26 animals, and it showed *Dynll 2* of *A. davidianus* was highly homologous to terrestrial animals or freshwater fishes. Moreover, we were able to express *Dynll 2* mRNA in 6 tissues of *A. davidianus*, followed by bowel, muscle, liver, lung, skin and stomach. The data of qRT-PCR, analyzed by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, indicated the plentiful presence of *Dynll 2* mRNA in muscle rather than other 5 tissues.

**Key words:** *Andrias davidianus*; skin cDNA library; *Dynll 2* gene; tissue expression; evolutionary relationship

**Corresponding author:** WANG Li-xin. E-mail: fisherwanglx@163.com