

杂色鲍 Fosmid 基因组文库构建与血蓝蛋白基因筛选

姜敬哲¹, 张彬彬², 张 远², 苏友禄¹, 王江勇¹

(1 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300; 2 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:以杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 肌肉组织为材料,按照 CopyControl™ Fosmid Library Production Kit 中方法构建了杂色鲍 Fosmid 全基因组文库. 从文库中随机挑取 50 个克隆进行 *Not* I 酶切鉴定发现,阳性率达到 100%,插入片段大小分布在 32~48 kb 之间,平均长度约 37.6 kb. 随机挑取 8 个克隆进行正、反向末端测序,获得了全部 16 个测序结果,其中 8 条序列确定为鲍来源基因序列. 进一步根据杂色鲍血蓝蛋白(Hemocyanin)基因 3'端序列设计特异引物,用 PCR 方法对基因组文库进行筛选,获得一个阳性克隆,经 Primer-Walking 测序、Blast 比对和进化分析证实,该序列为杂色鲍血蓝蛋白 II 型基因克隆.

关键词:杂色鲍; Fosmid; 基因组文库; 血蓝蛋白; 文库筛选
中图分类号:Q781 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2012)02-0192-05

Construction of Fosmid Genomic Library of *Haliotis diversicolor*
Reeve and Screening of Hemocyanin Gene

JIANG Jing-zhe¹, ZHANG Bin-bin², ZHANG Yuan², SU You-lu¹, WANG Jiang-yong¹

(1 South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;
2 College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:The foot muscle of small abalone, *Haliotis diversicolor* was used to construct the Fosmid genomic library according to the CopyControl™ Fosmid Library Production Kit. Fifty clones were randomly picked from library and identified by *Not* I digestion. The positive rate was 100%. Lengths of these inserts were between 32 to 48 kb and with the average length 37.6 kb. Another 8 clones were randomly picked to do the end sequencing. With total 16 sequence results, 8 of them were sure from abalone genomes. Further more, specific primers were synthesized according to the 3' end sequence of hemocyanin gene of small abalone. With the PCR (Polymerase Chain Reaction) based screen method, a positive clone was obtained and identified as the hemocyanin type II gene clone after Primer-Walking sequencings, Blast and phylogenetic tree analysis.

Key words:*Haliotis diversicolor*; Fosmid; genomic library; hemocyanin; library screen

杂色鲍 *Haliotis diversicolor* 是我国南方重要的海水养殖贝类,其味道鲜美,营养丰富,深受消费者喜爱. 由于环境污染日益加剧、养殖密度增加及鲍种质资源退化等问题的影响,鲍养殖中的各种病害频发,严重制约了鲍养殖业的健康发展^[1-5]. 为了应对鲍养殖中遇到的各种问题,人们需要更加深入地进行理

论研究来解决实践问题,尤其是从分子、细胞水平上对其功能基因、蛋白等生物大分子在生长发育和免疫调节等生命活动中发挥的作用进行探讨. 分子生物学的深入离不开基因组学研究成果的支持,而基因组学研究中最基础的就是大片段基因组文库的构建. 基因组文库的获得对保存物种遗传信息、功

收稿日期:2011-05-05
作者简介:姜敬哲(1980—),男,助理研究员,博士;通信作者:王江勇(1971—),男,研究员,博士, E-mail:wjy104@163.com
基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2010TS16);广东省海洋渔业科技推广专项(A 2008899E01);广东省科技计划项目(2010B20201014)

能基因筛选、图位克隆、分子标记开发、遗传育种以及基因组测序等工作的顺利进行具有非常重要的意义. 本文以杂色鲍为研究对象, 构建了高质量的杂色鲍 Fosmid 基因组文库, 进一步设计杂色鲍血蓝蛋白基因的特异引物, 通过 PCR 的方法对该文库进行了筛选, 并获得了 1 个血蓝蛋白基因克隆.

1 材料与方法

1.1 试验材料

杂色鲍采自汕尾某鲍养殖场, 壳长(40 ± 5) mm.

1.2 仪器及试剂

主要仪器: Millipore 纯水系统, Tanon 凝胶成像系统, 高速冷冻离心机 1-15PK 和 3K30 (Sigma), Nanodrop 微量核酸检测仪 (Thermo), 8 通道电动移液器 (Eppendorf research pro 100), BIO-RAD 电泳设备, PCR 仪 (TaKaRa) 等.

主要试剂: 限制性内切酶 *Not* I (TaKaRa), DL2000 和 λ -*Hind* III digest marker (TaKaRa), 平端化加磷试剂盒 TaKaRa BKL Kit, 修饰性连接酶 T4 DNA Ligase (TaKaRa); 低熔点胶 SeaPlaque GTG Agarose (CAMBREX); 溶胶酶 β -Agarose I (NEB); CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE), pCC1FOS 载体 (图 1); 蛋白酶 K (Promega); Low range PFG marker (NEB); DNA molecular weight marker XV® (Roche); 动物基因组和质粒提取试剂盒 (东盛生物), Hs *Taq* DNA 聚合酶 (东盛生物); 载体末端测序用引物 T7 promoter: TAATACGACTCACTATAGGG, BAC_R3_414L20: GCCAAGCTATTTAGGTGAG; 血蓝蛋白引物 HcF: ATCATGACTACGATGTTCTT, HcR: TACCACACAGTTGAAGAG.

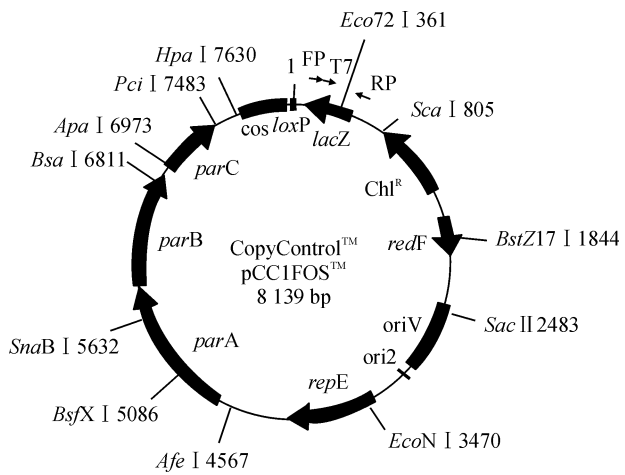


图 1 pCC1FOS™ 载体图
Fig. 1 pCC1FOS™ Vector Map

1.3 试验方法

1.3.1 基因组 DNA 提取与片段化处理 割取杂色鲍腹足肌肉组织, 液氮充分研磨后按照动物基因组提取试剂盒 (东盛生物) 操作说明书进行, 提取后的 DNA 溶液用 200 μ L 吸头采用反复吹打的方法, 对基因组 DNA 进行片段化处理, 进行电泳检测.

1.3.2 末端修复 根据 TaKaRa BKL Kit 操作说明配制混合体系, 主要成分包括 DNA 片段、末端修复酶混合物、10 $\times$ Buffer、dNTPs 和 ATP 等, 室温放置 1 h, 对 DNA 断裂末端进行补齐和磷酸化修复, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min, 使酶失活.

1.3.3 插入片段制备 配置 10 g/L 的低熔点琼脂糖凝胶, 脉冲电泳分离片段化的 DNA, 切胶回收 38 ~ 48 kb 之间的 DNA 片段. 割下的胶块放于 70 $^{\circ}$ C 水浴中至胶溶解, 加入溶胶酶和缓冲液, 45 $^{\circ}$ C 温浴过夜, 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min. 冰浴 5 min, 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 加入 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠 (pH 7.0) 和 2 倍体积无水乙醇, 混匀, 室温沉淀 10 min, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 体积分数为 70% 乙醇洗涤 DNA 2 次, 沉淀 DNA 风干后溶解于 TE 缓冲液中, 进行电泳检测.

1.3.4 载体连接 将回收后的 DNA 片段与 pCC1FOS 载体按照如下反应体系进行连接: 1 μ L 10 $\times$ Fast-Link Ligation Buffer, 1 μ L ATP (10 mmol/L), 1 μ L pCC1FOS Vector (0.5 μ g $\cdot$ μ L⁻¹), 0.25 μ g DNA 片段, 1 μ L Fast-Link DNA Ligase, 加水补齐至 10 μ L, 放置于室温 2 h, 然后 70 $^{\circ}$ C 10 min 灭活连接酶.

1.3.5 噬菌体包装 将连接产物加入到 25 μ L 包装蛋白 (MaxPlax lambda packaging extracts) 中, 混匀避免气泡产生, 将混合物置于 30 $^{\circ}$ C 反应 90 min, 再加入 25 μ L 包装蛋白 30 $^{\circ}$ C 继续反应 90 min, 结束后加入噬菌体稀释液 (Phage dilution buffer, PDB) 至终体积达到 1 mL, 加入 25 μ L 氯仿混匀后, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用.

1.3.6 滴度确认、转染与涂板 将包装产物用 PDB 按照 10² ~ 10⁵ 梯度稀释, 分别取 10 μ L 加入 100 μ L 的 EPI300-T1 大肠埃希菌细胞中, 37 $^{\circ}$ C 20 min, 涂布于含 12.5 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 氯霉素的 LB 平板上 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 筛选阳性克隆并计算滴度.

1.3.7 酶切与测序鉴定 从平板中随机选取 50 个白色单克隆, 培养后提取 Fosmid 质粒 DNA, *Not* I 酶切 4 h, 脉冲电泳鉴定插入片段长度. 从上述 50 个克隆中随机挑取 8 个克隆送宝生物工程 (大连) 有限公司进行末端测序, 测序引物为 T7 promoter 和 BAC_R3_414L20, 在 NCBI 上比对测序结果.

1.3.8 Fosmid 文库甘油菌的制作 以每孔约 100 个克隆的量进行 96 孔板菌体培养,37 ℃ 过夜培养后甘油保存.

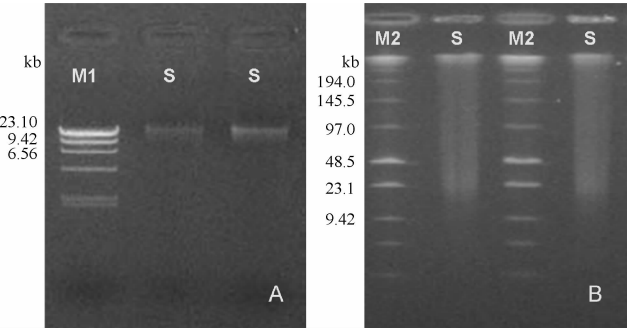
1.3.9 PCR 筛选血蓝蛋白基因克隆 于 96 孔 PCR 板上制备 PCR 反应体系,每孔反应体系为 15 μL:7.5 μL HS Mix,引物 Hc2F383 和 Hc2R546(5 μmol/L)各 1.5 μL,不足部分用水补齐,用排枪沾取文库板中菌液在 PCR 板的对应孔中混匀. PCR 反应程序:95 ℃ 4 min 预变性;然后 95 ℃ 40 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 20 s 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min,电泳检测扩增结果. 从文库板上吸取 1 μL 阳性菌液加入 1 mL 的 LB 培养液中,混匀取 100 μL 菌液涂平板,37 ℃ 培养过夜,第 2 天以同样的 PCR 体系和程序,进行菌落 PCR 检测筛选阳性克隆.

1.3.10 测序与序列分析 克隆送由宝生物工程(大连)有限公司进行测序,所得序列用 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)进行比对,基因预测与外显子分析用 FGENESH(<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenesh&group=programs&subgroup=gfind>),进化树绘制使用 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeview.cgi>)的 Blast Tree View 工具进行.

2 结果与分析

2.1 杂色鲍总 DNA 的提取

DNA 提取的质量对基因组文库的构建至关重要,文中使用了商业化的动物基因组提取试剂盒,操作过程尽量轻柔,以降低机械剪切对 DNA 的影响. 由图 2A 和图 2B 的电泳结果可见,此次制备的基因组 DNA 完整性较好,基因组 DNA 片段多集中在 200 kb(图 2B)以上区域,降解不明显,可用于构建 Fosmid 文库.



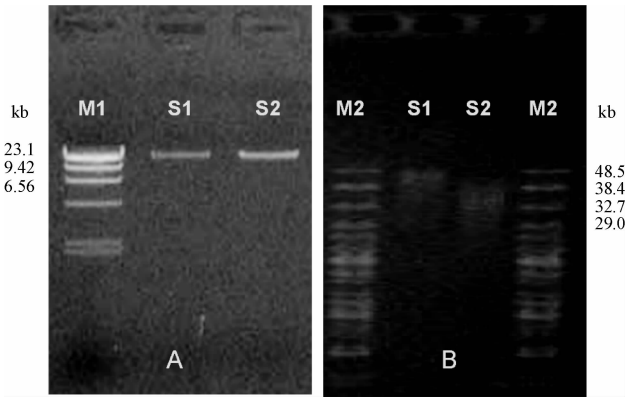
M1:λ-Hind III digest; M2: Low range PFG marker; S: 杂色鲍总基因组 DNA; A: 普通电泳结果; B: 脉冲电泳结果.

图 2 杂色鲍总基因组 DNA 电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis results of total genomic DNA of small abalone

2.2 Fosmid 文库构建与检验

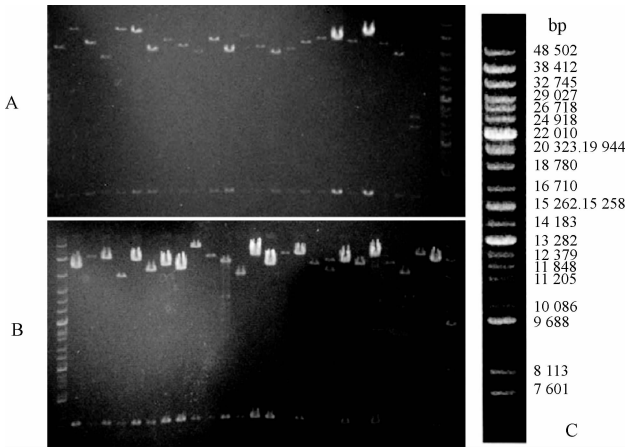
由于 Fosmid 载体只能携带 30 ~ 50 kb 大小的 DNA 片段,为了提高载体重组效率、防止小片段的嵌合插入,本研究采用凝胶回收的方法,特异割取大小为 30 ~ 48 kb 的 DNA 片段,用普通电泳和脉冲电泳检验片段回收效果,如图 3A 和图 3B 所示,回收片段纯度良好,大小符合建库要求. 从建好的文库中随机挑取 50 个白色菌落提取质粒 DNA,Not I 酶切检测发现,全部克隆均插入 DNA 片段,阳性率达到 100%,插入片段大小分布在 32 ~ 48 kb 之间(图 4),根据电泳结果估算插入片段平均长度约为 37.6 kb.



M1:λ-Hind III digest(100 ng); M2: DNA molecular weight marker XV®; S1 和 S2:回收 DNA 片段; A:普通电泳结果; B:脉冲电泳结果.

图 3 回收 DNA 片段电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis results of extracted DNA fragments of small abalone



A、B:50 个随机挑取的文库质粒酶切脉冲电泳图; C: DNA molecular weight marker XV® 示意图

图 4 Fosmid 文库质粒 Not I 酶切检测电泳图

Fig. 4 Electrophoresis results of Fosmid plasmid digested by NotI

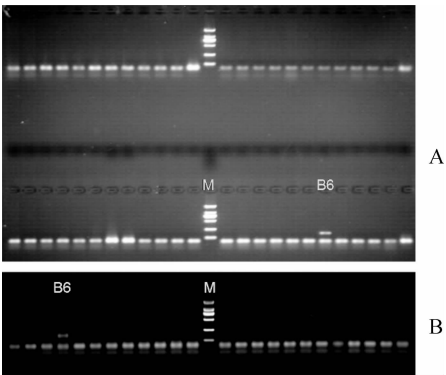
从上述 50 个克隆中随机挑取 8 个克隆送到生物公司测序,考虑到插入片段太大,每个克隆使用通用引物只进行了正、反向 2 个末端的测序,共获得了全部 16 个测序结果. 经 Blast 分析后,其中 8 个测序结果确定为鲍来源基因组序列,另有 8 条序列在 NCBI 中没

有比对结果,但也没有证据证明这些未知序列是来自其他生物的基因组(如细菌或人操作的污染)。

由上述酶切和测序结果可以认定,该基因组文库的构建是成功的,获得了 46 块 96 孔板中保存的杂色鲍 Fosmid 基因组文库,其中板上的每个孔作为一个克隆池(Clone pool),装载有约 100 种左右的文库克隆,以方便文库筛选。因此,每个 96 孔板中约含有 9 600 种克隆,46 块板所包含的全部克隆即为 441 600 个,又因该文库平均插入片段长度为 37.6 kb,因此该文库的基因组容量约为 16.6 Gb。

2.3 血蓝蛋白基因的文库筛选

在早前研究所获得的杂色鲍 EST 文库数据^[6-7]基础上,以杂色鲍血蓝蛋白基因 3'端 EST 序列(Gen-Bank Acc:GT866674)为模板,设计了 2 条特异引物 HcF 与 HcR,首先以杂色鲍基因组模板进行 PCR 预试验检测,引物的扩增效率较高、特异性好,PCR 产物 167 bp,经测序验证与目标基因序列 100% 一致。进而,我们使用该引物对杂色鲍 Fosmid 文库的 2 块 96 孔板进行了 PCR 筛选,从其中一块板中编号为 B6 的孔中检测到了目标产物的扩增(图 5A),随后吸取少量 B6 菌液稀释涂布培养,继续对 LB 平板进行 PCR 筛选,最终得到 1 个阳性克隆菌(图 5B)。



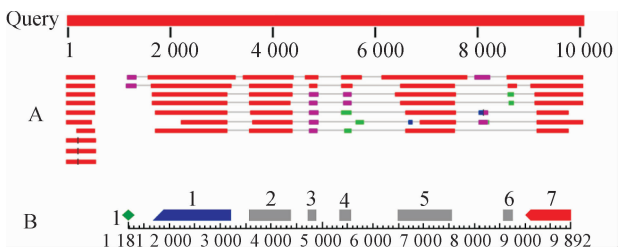
M;Ladder DL2000 marker, 从上到下条带大小依次为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp;B6;引物 HcF 与 HcR 的 PCR 阳性结果,片段大小为 167 bp;A;第 1 轮筛选 96 孔板的 PCR 结果;B;第 2 轮筛选 LB 平板的 PCR 结果。

图 5 血蓝蛋白基因 3'端引物筛库电泳图
Fig. 5 Electrophoresis results of library screen of 3' end of hemocyanin gene

2.4 血蓝蛋白基因序列分析

采用 Primer walking 的方法对 B6 克隆进行测序,目前已经获得 10 021 bp 的基因组序列,对该序列进行 Blastn 比对发现,从起始到 570 bp 位置的序列为 pCC1FOS 载体序列,随后近 10 kb 的序列均为血蓝蛋白基因序列(图 6A),其编码区序列与报道的 *H. tuberculata* (AJ297475) 和 *Megathura crenulata*

(AJ698342) 血蓝蛋白 II 型基因序列相似性最高,与 *H. tuberculata* (AJ252741) 和 *H. diversicolor* (GQ352369) 血蓝蛋白 I 型基因序列的相似性次之。进一步使用 FGENESH 对该基因的结构和外显子进行了预测(图 6B),发现预测结果与 Blastn 结果基本吻合,说明该基因具有真核生物典型的剪切位点,并且不同来源血蓝蛋白基因外显子区的保守性远高于内含子区的保守性。



A;Blastn 比对分析结果示意图; B;FGENESH 分析结果示意图。红、灰、蓝表示外显子区段,绿色表示 polyA 加尾信号。

图 6 B6 克隆基因序列分析结果示意图
Fig. 6 Sketch map of B6 clone gene sequence

以 FGENESH 预测的蛋白序列为基础,进一步与 NCBI 中比对到的相似蛋白序列做进化树分析(图 7),可见 B6 蛋白序列(Query)与 *H. tuberculata*、*M. crenulata* 和 *Aplysia californica* 等腹足纲 Gastropods 软体动物血蓝蛋白序列同属一个进化分支,与双壳纲 Bivalves 的 *Nucula nucleus* 亲缘关系也较接近,但与头足纲 Cephalopods 的巨人章鱼 *Enteroctopus dofleini* 和 *Sepia officinalis* 关系较远。此外,该蛋白处于 II 型血蓝蛋白序列的小分支中,说明文中筛选到的克隆为杂色鲍血蓝蛋白 II 型基因序列。

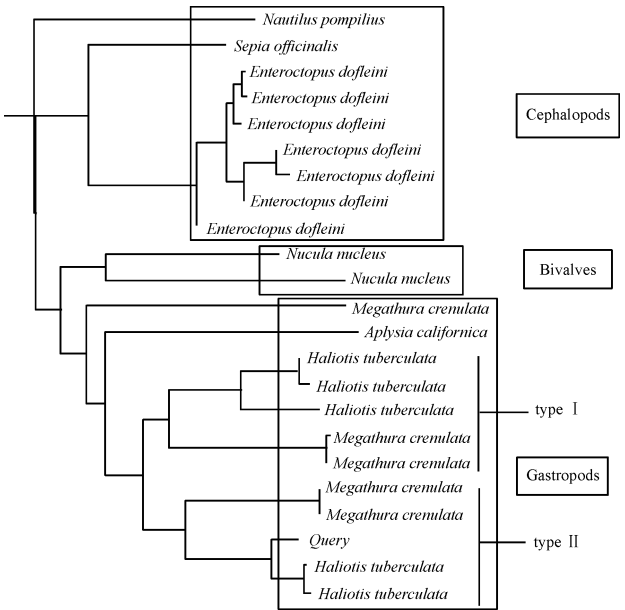


图 7 B6 蛋白序列的进化树分析
Fig. 7 Phylogenetic tree analysis of B6 protein sequence

3 讨论

动物基因组文库研究中,使用最多的是 BAC (Bacterial artificial chromosome) 和 Fosmid 载体. 2 种载体均以大肠埃希菌 F 因子 (Fertility factor) 为基础, F 质粒在大肠埃希菌中多以单拷贝存在,复制稳定且具有携带大片段基因组的能力^[8-13],经改造后的载体可被诱导成为多拷贝质粒,方便下游操作. BAC 载体携带的片段通常为 Fosmid 载体的 2 倍以上(100 kb 以上),无需很高库容即可获得能够覆盖目标基因组的重叠群^[9],但 BAC 不能对插入片段大小进行筛选,空载率较高,容易导致小片段及其嵌合片段的插入,影响结果分析. 由于 Fosmid 载体只能重组 30 ~ 50 kb 大小的片段,能够有效避免空载和嵌合基因片段的插入,提高了克隆分析的准确性^[10-13]. 此外,由于基因组不同区段的序列特征差异很大,使用酶切方法获得的基因组片段会产生较大偏倚性,本研究使用物理方法对基因组进行了随机剪切,能够较好地避免偏倚性的产生^[12].

虽然杂色鲍基因组大小未知,但根据文献报道^[14],3 种加州鲍的单倍体基因组大小(*C* 值)分别为:*H. corrugate* (2.14 ± 0.45) pg, *H. rufescens* (1.82 ± 0.36) pg 和 *H. fulgens* (1.71 ± 0.33) pg. 根据公式 $1 \text{ pg} = 978 \text{ Mb}$,可得鲍基因组的大概范围:2 533 ~ 1 350 Mb. 本文所构建的基因组文库平均插入片段为 37.6 kb,每孔约有 100 个克隆,46 个 96 孔板中所涵盖的基因组片段总长度为 16.6 Gb. 根据 Clarke 和 Carbon 理论统计公式 $N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f)$ 计算, P 为从本文库中筛选出鲍基因组任一单拷贝基因的机率, f 为克隆子插入片段与目标基因组大小的比值, N 为文库所含克隆子数^[15]. 本文中 f 的范围:37.6/253.3 万 ~ 37.6/135 万, $N = 100 \times 96 \times 46$,由此计算 P 值为 99.86% ~ 99.99%,即本文所构建的鲍基因组文库能够对任意单拷贝基因实现 99.8% 以上的筛选命中率.

目前,基于 PCR 的文库筛选方法已经基本替代了传统的杂交筛选方法^[8, 11],适用于 cDNA 文库、基因组文库等各类型的文库筛选. 该方法操作简单、速度快、灵敏度高且无需使用同位素. 本研究以 96 孔板作为载体,每孔直接分装含有约 100 种克隆的混合菌液,极大缩小了文库体积并降低了工作量,同时每孔作为一个克隆池,能够加快 PCR 的筛选进程. 从课题组对该库的应用实践看,对于多数基因通常 PCR 筛选 2 ~ 4 块 96 孔板后即可获得 1 个阳性克隆孔,通常在 3 d 内即可得到 1 个目标单克隆,效率较

高(未发表数据).

软体动物血蓝蛋白是生物界中较大的蛋白之一,通常由 2 种亚基蛋白组成,每个亚基相对分子质量约为 40 万,分别由 2 个基因编码,二者外显子区序列相似性较高,但内含子无相似性^[16-17]. Lieb 等^[18]采用同源克隆、RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 等研究技术,对欧洲瘤鲍 *H. tuberculata* 中 2 个血蓝蛋白亚基基因进行了克隆,但 2 序列都缺少完整的 N 末端. 本研究采用基因组文库筛选的方法,得到了血蓝蛋白 II 型亚基克隆,相比传统基因克隆方法成本显著降低、时间大大缩短. 由于 Fosmid 基因组文库插入片段通常为 30 kb 以上,远大于多数基因序列的长度,即便对于血蓝蛋白这种较大的基因,理论上只要筛选到 2 个重叠克隆即可获得完整的基因序列.

综上所述,本研究构建了高质量的杂色鲍 Fosmid 基因组文库,进一步使用血蓝蛋白特异引物对该文库进行了筛选,获得了 1 个血蓝蛋白 II 型基因克隆. 该文库的构建为鲍分子生物学研究建立了良好的技术平台,通过文库筛选方法获得血蓝蛋白基因序列为深入开展鲍重要功能基因相关研究提供了良好范例.

参考文献:

- [1] WANG Jiang-yong, GUO Zhi-xun, FENG Juan, et al. Virus infection in cultured abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve in Guangdong province, China [J]. J Shellfish Res, 2004, 23: 1163-1168.
- [2] 刘广锋,徐力文,黄建荣,等. 杂色鲍养殖环境中致病性弧菌分布调查 [J]. 南方水产, 2005, 1(3): 60-64.
- [3] 王江勇,王瑞旋,刘广锋,等. 杂色鲍幼苗大规模死亡与细菌数量的关系 [J]. 南方水产, 2005, 1(1): 57-61.
- [4] ZHUANG Jun, CAI Gui-qin, LIN Qi-ying, et al. A bacteriophage-related chimeric marine virus infecting abalone [J]. PlosOne, 2010, 5(11): e13850.
- [5] 王江勇,孙秀秀,王瑞旋,等. 杂色鲍肌肉萎缩症病原菌的分离鉴定及系统发育分析 [J]. 南方水产, 2010, 6(5): 21-26.
- [6] 姜敬哲,张微,王江勇,等. 哈维氏弧菌感染的杂色鲍全组织均一化 cDNA 文库的构建 [J]. 南方水产, 2010, 6(5): 37-42.
- [7] JIANG Jing-zhe, ZHANG Wei, GUO Zhi-xun, et al. Functional annotation of an expressed sequence Tag library from *Haliotis diversicolor* and analysis of its plant-like sequences [J]. Marine Genomics, 2011, 4(3): 189-196.

(下转第 202 页)

额区背面具 FR_1 , 下唇背面缺 LA_6
..... 石坑崆步甲 *C. (A.) shikengkong*

3 讨论

目前欧洲的大多数步甲属幼虫都被描述, 我国步甲属种类非常丰富, 特有成分高^[9], 而对其幼虫进行分类的工作才刚刚起步. Liu 等^[3]首次运用原生刚毛标记分类法对切鞘步甲亚属的模式种奇步甲 *C. prodigus* 幼虫进行了描述, 与奇步甲相比, 本文描述的 4 种幼虫中, 只有舜步甲南岭亚种的鼻突与其一致, 具有 3 个齿, 并在鼻区的两侧齿外都有一排附生刚毛. 由于切鞘步甲亚属种类繁多, 亚属内又分为许多种组, 而目前对该亚属幼虫的描述很少, 这方面的研究有待展开, 以便为步甲属昆虫系统学的研究提供科学依据.

参考文献:

[1] ARNDT E, BRÜCKNER M, MARCINIAK M, et al. Phylogeny[M]//TURUN H, PENEV L, CASALE A. The genus *Carabus* L. in Europe, a synthesis. Sofia-Moscow: Pensoft Publishers, 2003:307-325.
[2] DEUVE T. Illustrated catalogue of the genus *Carabus* of the world (Coleoptera: Carabidae) [M]. Sofia-Moscow:

Pensoft, 2004:461.
[3] LIU Gui-qing, DEUVE T, TIAN Ming-yi. Larval description of *Carabus prodigus* Erichson, with discuss of the position of the subgenus *Apotomopter* within the genus *Carabus* L. (Coleoptera: Carabidae) [J]. Coleopts Bull, 2009, 63(2): 221-227.
[4] GOULET H. Technique for the study of immature coleopteran in glycerine [J]. Coleopts Bull, 1977, 31:381-382.
[5] 屈娟. 四种步甲一龄幼虫的形态研究 [J]. 昆虫分类学报, 1996, 18(4): 283-293.
[6] BOUSQUET Y, GOULET H. Notation of primary setae and pores on larvae of Carabidae (Coleoptera: Adephaga) [J]. Can J Zool, 1984, 62(4):573-588.
[7] BOUSQUET Y. Description of first-instar larva of *Metrius contractus* Eschscholtz (Carabidae) with remarks about phylogenetic relationships and ranking of the genus *Metrius* Eschscholtz [J]. Can Entomol, 1986, 118: 373-388.
[8] BOUSQUET Y, SMETANA A. A description of the first instar larva of *Promecognathus chaudoir* [J]. Syst Entomol, 1986, 11: 25-31.
[9] 田明义. 中国步甲属(鞘翅目: 步甲科)物种多样性及其保护问题 [J]. 昆虫天敌, 2000, 22(4): 151-154.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 196 页)

[8] 耿波, 关云涛, 孙效文. 黑龙江野鲤细菌人工染色体基因组文库构建 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(2): 165-172.
[9] 张巨永, 黄盛丰, 王蔚, 等. 白氏文昌鱼单个体基因组 BAC 文库的构建 [J]. 遗传, 2010, 32(1): 67-72.
[10] 孙晓华, 张全启, 王旭波, 等. 半滑舌鳎雌鱼基因组 Fosmid 文库构建及分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(8): 88-92.
[11] 马宁, 曾地刚, 陈晓汉. 凡纳滨对虾基因组 Fosmid 文库的构建及钙离子通道基因的筛选 [J]. 武汉大学学报: 理学版, 2010, 56(3): 348-352.
[12] 茅云翔, 崔菁菁, 孔凡娜. 条斑紫菜基因组 Fosmid 文库构建 [J]. 水产学报, 2009, 33(3): 396-402.
[13] 程洁, 张玲玲, 黄晓婷, 等. 栉孔扇贝 Fosmid 文库的构建及基因组结构特征分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(1): 78-88.

[14] CRISTIAN G, MIGUEL A D R. Karyotype composition in three California abalones and their relationship with genome size [J]. J Shellfish Res, 2007, 26(3): 825-832.
[15] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2003: 863-864.
[16] DECKER H, HELLMANN N, JAENICKE E, et al. Minireview: Recent progress in hemocyanin research [J]. Integrative and Comparative Biology, 2007, 47(4): 631-644.
[17] 彭文, 王江勇, 丁雪娟. 杂色鲍血蓝蛋白的分离纯化与酚氧化酶活性研究 [J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 52-58.
[18] LIEB B, ALTENHEIN B, MARKL J, et al. Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98: 4546-4551.

【责任编辑 柴 焰】