DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.10113

鲫鱼低氧相关基因差减 cDNA文库的构建与分析

钟雪萍[1,2]　王　丹[1]　张义兵[1]　桂建芳[1]

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉　430072;
2. 华中师范大学生命科学学院, 武汉　430079)

摘要:鲫鱼对低氧具有极强的耐受性。在低氧状态下鲫鱼鳃瓣表面积增加,无氧代谢增强,能量消耗降低。但是人们对鲫鱼产生这些低氧反应的分子机理还缺乏了解。本研究以 1%低氧处理 24h的鲫鱼囊胚细胞 (CAB)作为检测子 (Tester),常氧条件下培养的 CAB细胞作为驱赶子 (Driver),分别提取总 RNA,利用 SMART cDNA技术合成双链 cDNA,经差减杂交和抑制性 PCR扩增获得差减 PCR产物。然后将差减 PCR产物连接到 pGEM-T载体上,构建差减 cDNA文库。以管家基因 β-*actin*作为指标检测差减效率,发现该文库差减效率达 2^8 倍。随机挑选阳性克隆进行 PCR检测,显示差减片段在 0.1—2kb之间。挑取含有插入片段的 1300个克隆进行测序,通过生物信息学分析获得 267个基因序列 ($e \leq 0.001$; Identity > 40%)。该差减 cDNA文库的成功构建对克隆鱼类耐低氧相关基因和深入认识鱼类耐受低氧的分子机制有非常重要的意义。

关键词:鲫鱼囊胚细胞;低氧相关基因;抑制性差减杂交
中图分类号: Q785　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2009)01-0113-06

氧是生物生长和生存必需的环境因子。水中溶解氧减少可导致鱼类摄食量减少,生长速度减慢,生殖力下降,甚至死亡[1,2]。近年来,随着经济和人口的快速增长,以及水产养殖业集约化程度的提高,低氧问题日益突出,给渔业养殖带来巨大损失[1,3]。由于目前还没有特别有效的预防低氧的方法,因此深入研究鱼类耐受低氧的分子机制将有助于鱼类低氧损伤预防和今后抗低氧的分子育种工作。

鲫鱼 (*Carassius auratus* L.)是世界性分布鱼类,生活于中下层水域,对低氧具有极强的耐受性。目前,研究发现在低氧状态下鲫鱼鳃瓣表面积增加,无氧代谢增强,能量消耗降低[4—7]。但是人们对鲫鱼产生这些低氧反应的分子机理还缺乏了解。有报道指出,低氧诱导因子 (Hypoxia inducible factor, HIF)和低氧反应基因在机体耐受低氧的分子反应中起着非常重要的作用[8,9]。目前鲫鱼 HIF1α的 cDNA序列已被克隆和鉴定[10]。但迄今还没有见到系统研究低氧状态下鲫鱼基因表达变化的报道。

抑制性消减杂交技术 (Suppression Subtractive Hybridzation, SSH)是近年来发展起来的一项新的基因克隆技术,与传统的方法比较具有实验周期短,易操作,可靠性高,假阳性率低等特点,能有效地分离扩增低丰度差异表达的基因[11,12]。本研究将应用该技术构建低氧处理鲫鱼囊胚细胞后差异表达基因的 cDNA消减文库,筛选鲫鱼的低氧相关基因,为克隆鲫鱼低氧相关基因和深入探讨鱼类耐受低氧的分子机制提供新的理论依据。

1　材料与方法

1.1　细胞系　鲫鱼囊胚细胞系 (Blastulae embryonic cells of crucian carp, CAB)由本实验室建立,用辅加 10%小牛血清的 199培养基置 27℃培养。

1.2　培养细胞的低氧处理　挑取生长状态良好的 CAB细胞 4瓶,随机分成两组,分别作为处理组和对照组。待细胞培养长至单层后,将处理组细胞放入三气培养箱,用含 1%O_2 和 99%N_2 的混合气体低氧处理 24h。对照组细胞仍放于原培养箱培养。三气培养箱为美国 Thermo公司产品。

收稿日期: 2008-01-02;**修订日期**: 2008-12-29
基金项目:科技部 973项目 (2004CB117403); 国家自然科学基金 (300500375)资助
作者简介:钟雪萍 (1973—),女,河南潢川县人; 环境科学博士; 主要从事生态毒理学和鱼类分子生物学的研究。E-mail: zhongxp73@yahoo.com.cn
通讯作者:桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

1.3 细胞总 RNA的提取 用 SV Total RNA Isolation System (Promega)提取未经低氧处理的和经低氧处理 24h的 CAB细胞的总 RNA,然后用分光光度计测定总 RNA浓度。

1.4 双链 cDNA的合成 按合成 SMART cDNA的方法合成双链 cDNA。取处理组和对照组细胞总 RNA各 0.5μg与 cDNA合成引物 (CDS primer)和 SMART Ⅱ寡聚核苷酸引物各 1μL混合,补水到终体积为 5μL, 72℃保温 2min后,置冰上速冷 2min,然后在终体积 10μL的反应体系中,加入 5×第一链反应缓冲液 2μL、DTT (20mmol/L) 1μL、dNTP (10mmol/L) 1μL, PowerScript反转录酶 1μL, 42℃保温 1h合成第一链 cDNA。取 2μL第一链 cDNA于 100μL体系中,加入 dNTP 2μL、PCR引物 4μL和 2μL 50×Advantage cDNA Polymerase Mix,进行 LD-PCR进行第二链合成。PCR反应参数为: 95℃预变性 1min,然后 95℃ 5s, 65℃ 5s, 68℃ 6min, 17个循环。

1.5 抑制性差减杂交 采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech)提供的方法进行差减杂交。首先,分别制备 CAB细胞的 Driver cDNA和 Tester cDNA。用 *Rsa* Ⅰ充分酶切未经低氧诱导的 CAB细胞的双链 cDNA后完成 Driver cDNA的制备。Tester cDNA的制备是将低氧诱导的 CAB细胞双链 cDNA用 *Rsa* Ⅰ酶切后,分成两份,分别与 adaptor 1和 adaptor 2R连接后即制成 Tester1-cDNA和 Tester2-cDNA。Tester1 cDNA和 Tester2 cDNA分别与 Driver cDNA进行第一次杂交,混合两种杂交产物,再与新变性的 Driver cDNA进行第二次杂交。杂交产物然后以引物 primer1进行第一次 PCR扩增,第一次 PCR产物再用引物 Nested primer1和 2R进行第二次 PCR扩增,使差异表达基因得到指数扩增。进行差减杂交的同时,也制备未差减 cDNA以检测差减文库的差减效率。

1.6 接头连接效率的检测 接头连接效率的检测以鲫鱼管家基因 β-*actin*为指标。以鲫鱼 β-*actin*的特异上游引物和下游引物为一个组合、以及试剂盒提供的接头引物 PCR primer1 (5′-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3′)和 β-*actin*的下游引物为一个组合进行 PCR扩增,比较不同引物组合扩增产物的大小及产量,鉴定连接效率的优劣。PCR反应条件为: 75℃ 5min, 94℃ 5min,然后 94℃ 30s, 50℃ 30s, 72℃ 1min扩增 30个循环。鲫鱼 β-*actin*基因的上游引物和下游引物序列分别为: 5′-CACTGTGCCCATCTACGAG-3′和 5′-CCATCTCCTGCTCGAAGTC-3′。

1.7 差减效率的检测 以差减 cDNA和未差减 cDNA为模板,以鲫鱼管家基因 β-*actin*为指标,检测差减 cDNA文库的差减效率。所用引物为鲫鱼 β-*actin*基因的上游引物和下游引物。PCR反应条件除没有 75℃ 5min外,其余皆与上同。

1.8 低氧反应基因差减 cDNA文库的构建 将获得的正向 SSH产物插入 pGEM-T载体 (Promega),转化 *E. coli* DH5α感受态细胞,用氨苄青霉素和蓝/白斑法筛选阳性克隆。

1.9 差减文库 cDNA片段大小检测、测序及序列比较分析 随机挑选白色菌落, 37℃培养 4h。取 0.5μL菌液,用差减试剂盒提供的引物 Nested1和 Nested2R检测插入片段大小。PCR扩增参数为: 94℃ 15s, 65℃ 30s, 72℃ 2min共 30个循环。随机从 1800个阳性克隆中挑选片段大小在 200bp以上的克隆 1300个进行测序。将所测 ESTs序列在美国生物信息中心网站进行在线 BLAST分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA的电泳鉴定

在低氧处理 CAB细胞 24h后,收集低氧处理和未经低氧处理的 CAB细胞,用 SV-Total法提取细胞总 RNA。将 RNA冷冻干燥后重新用水溶解。紫外分光光度计测定 RNA的 OD260/OD280比值均在 1.8—2.0之间。电泳显示 28S、18S条带清晰 (图 1),表明制备的 RNA质量达到了建库要求。

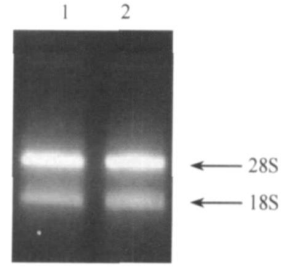


图 1 CAB细胞总 RNA提取结果

Fig 1 Total RNA extracted from CAB cells

1. 低氧处理 CAB细胞的总 RNA; 2. 未经低氧处理 CAB细胞的总 RNA

1. Total RNA from hypoxia-treated CAB cells; 2. Total RNA from untreated CAB cells

2.2 低氧处理和未经低氧处理的 CAB细胞 SMART cDNA的合成

取低氧处理和未经低氧处理的 CAB细胞的总 RNA,按 SMART cDNA文库合成的方法进行第一链 cDNA的合成,然后进行 LD-PCR合成第二链。在进

行 LD-PCR时,我们对 PCR循环数进行了筛选和鉴定(图 2),PCR循环数为 17时较为适宜。

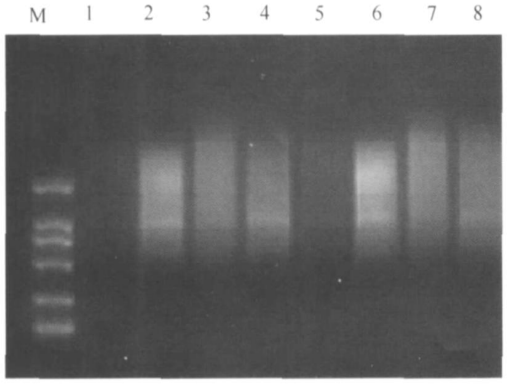


图 2　未经低氧处理和低氧处理的 CAB细胞的 SMART cDNA

Fig 2　Smart cDNA from hypoxia-treated and untreated CAB cells

M. DL 2000 DNA标准分子量; 1-4. 未经低氧处理 CAB细胞在 15、18、21和 24个循环时的 Smart cDNA; 5-8. 低氧处理 CAB细胞在 15、18、21和 24个循环时的 Smart cDNA

M. DL 2000 DNA marker; 1-4. Smart cDNA from untreated CAB cells at 15, 18, 21 and 24 cycles respectively; 5-8. Smart cDNA from hypoxia-treated CAB cells at 15, 18, 21 and 24 cycles respectively

2.3　Tester cDNA的接头连接效率检测

以 Tester 1-cDNA和 Tester 2-cDNA为模板,用 β-*actin*基因 3端特异引物和 PCR Primer1做 PCR,所获得的产物在亮度上与用 β-*actin*基因 3′5特异引物所扩增的产物一致,说明接头连接效率达到了建库的要求(图 3)。

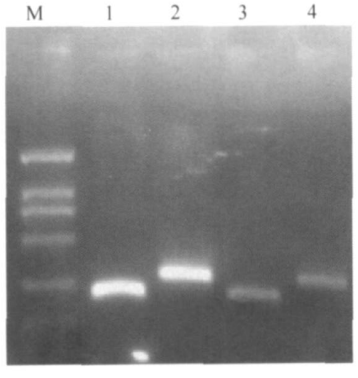


图 3　Tester cDNA接头的连接效率检测

Fig 3　Results of the adaptor ligation efficiency analysis

M. DL 2000 DNA标准分子量; 1/3. 用 β-*actin*的上游和下游引物做 PCR所得物; 2/4. 用 PCR Primer1和 β-*actin*的下游引物做 PCR产物

M. DL 2000 DNA marker; 1/3. PCR product amplified by β-*actin* upstream primer and downstream primer; 2/4. PCR product amplified by PCR Primer1 and β-*actin* downstream primer

2.4　差减 cDNA文库差减效率检测

为确保在 tester和 driver样本中表达基本无差异的基因得到有效的消减,即在消减片段库中的相对丰度显著降低,本实验进行了抑制消减效率的初步鉴定。我们选择了已被证明在 Tester和 Driver样本中表达基本无差异的 β-*actin*基因作为扩增对象,通过不同轮次的扩增,观察其在等量消减 cDNA库和未消减 cDNA库中的相对丰度。在未消减 cDNA库 β-*actin*经 15个循环扩增就可见明显的特异扩增条带,并且随着扩增轮次的增加,产物量逐步提高。而在等量消减 cDNA库中 β-*actin*经过 23轮循环才有较弱的扩增。说明经过两轮杂交和两轮抑制 PCR,已经成功地将两种样品中都存在的管家基因 β-*actin*基因拷贝数大幅度降低,消减效率达到 2^8。管家基因 β-*actin*在消减 cDNA和未消减 cDNA中含量出现显著差异,表明 Tester和 Driver样本中共有的 cDNA已被有效消除,同时也表明某些特异于低氧反应的差异表达基因也相应富集了同样的倍数。

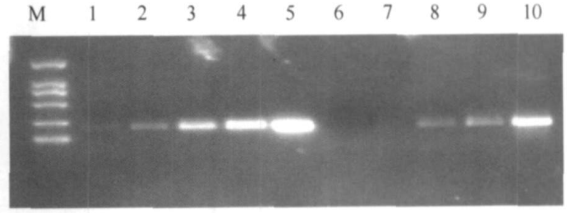


图 4　PCR检测 β-*actin*的差减效率

Fig 4　Subtraction efficiency of β-*actin* cDNA between subtracted cDNA and unsubtracted cDNA detected by PCR

M. DL 2000 DNA marker; 1/6, 15个循环; 2/7, 18个循环; 3/8, 23个循环; 4/9, 28个循环; 5/10, 33个循环

M. DL 2000 DNA marker; 1—5. PCR products of unsubtracted cDNA in 15, 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively; 6—10. PCR products of subtracted cDNA in 15, 18, 23, 28 and 33 cycles, respectively

2.5　差减文库 cDNA片段的 PCR筛选

将差减 cDNA片段连接入 pGEM-T载体,得到含近 2200个克隆的质粒文库,并对这些克隆进行 PCR筛选。弃阴性克隆和 PCR产物是多条带的克隆,得到 PCR产物为单一条带的有效克隆近 1800个,其插入片段在 0.1—2kb之间,图 5为随机挑取的 13个克隆的 PCR结果。

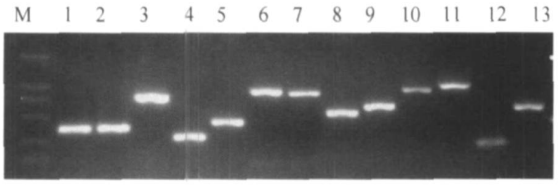


图 5 差减 cDNA质粒文库中插入 cDNA片段大小的鉴定

Fig 5 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA library

M. DL 2000 DNA marker; 1—13. 从差减文库中随机挑取的 13 个克隆

M. DL 2000 DNA marker; 1—13. 13 colonies randomly selected from the subtractive cDNA library

2.6 测序及在线 Blast分析

从差减 cDNA 文库中随机挑选片段大小在200bp以上的 1300个阳性克隆进行测序,最终得到1117个克隆的 ESTs序列。将所得的 ESTs片段用BLASTx在 GenBank中进行同源搜索,发现有 446个 EST序列与 267个基因同源 (e value ≤0.001; Identity > 40%),其中 39个为未知基因, 228个为已知或已命名基因。通过分析已知或已命名基因的功能和性质,发现这些涉及代谢、信号传导、细胞防御、细胞凋亡、细胞结构、血管形成与氧气运输、基因表达、细胞增殖等生理生化过程 (表 1)。

表 1 差减文库 ESTs(e value≤0.001; Identity > 40%)的分类

Tab. 1 Classification of the ESTs (e value≤0.001; Identity > 40%) according to their predicted functions

基因分类 Classfication	克隆数 Clone number	基因数 Gene number
代谢相关基因 Mechanism	151	78
细胞增殖相关基因 Cell proliferation	11	6
信号传导相关基因 Signal transduction	56	40
细胞结构相关基因 Cell structure	17	12
转录翻译相关基因 Transcription & Translation	34	25
细胞防御相关基因 Cell defense	57	33
血管形成与氧气运输相关基因 Anginesis & Oxygen transport	19	7
未分类基因 Unclassfied	42	27
未知基因 Unknown	59	39
总计 Total	446	267

3 讨 论

低氧适应是机体在低氧环境中或在缺氧状态下为维持基本生命活动所建立的一种保护性机制。有报道指出哺乳动物和人类的低氧适应是多层次的缺氧信号级联传递网络与多基因反应的协同行为。其中低氧适应相关基因作为一类能够接受低氧信号调节,并参与低氧适应性反应的基因群,是低氧适应机制重要的分子基础[8,9]。鱼类具有与哺乳动物相似的生理系统。已有的研究表明鱼类可能有着与哺乳动物相似但又不完全相同的抗低氧分子机制[13]。因此系统认识鱼类低氧适应基因对有效预防低氧损伤和今后抗低氧的分子育种工作有非常重要的意义。

鱼类作为水生态系统的主要成员,其生活的水环境中溶解氧浓度随时间、季节、地域和环境条件的不同存在很大差异,大多数鱼类在生长和发育的过程中都不可避免地会受到低氧的危害。因此,鱼类在长期进化的过程中获得了许多抵抗低氧的适应机制。在鱼类低氧的生理适应方面,已有的研究表明鱼类可通过增强氧的运送能力、降低能量消耗、保证能量供应和提高免疫力来对低氧产生适应性反应[14—18]。在鱼类低氧适应的分子机制方面,人们利用基因芯片技术筛选和鉴定了一些鱼类低氧反应基因,基因功能主要涉及细胞代谢与氧气运输等[19,20]。但目前总的来说有关低氧反应基因的克隆及其表达调控机制等方面的研究进展还比较缓慢。原因主要是由于利用基因芯片技术所筛选基因片段的种类是人为限制的,基因芯片制备过程中基因的种类和数量就已经决定了检测结果的范围,因此不利于差异表达的新基因的克隆。另外由于在实验过程中所用材料均为活鱼,而不同个体和不同组织对低氧产生的反应存在差异,因而给系统研究鱼类低氧适应的分子

www.cnki.net

机制带来许多不便。因此利用抑制性差减杂交技术筛选新的低氧相关基因,并以鲫鱼囊胚细胞为材料建立一个适于系统研究鱼类抗低氧分子机制的细胞系统非常必要。

已有的实验表明,在构建差减 cDNA文库的过程中,mRNA的质量、接头连接效率和差减效率高低是决定差减 cDNA文库质量的关键[21]。传统的实验认为,要成功利用 SSH方法首先必须分离纯化 mRNA才能保证反转录合成高质量的双链 cDNA[12]。本实验采用 SV-Total试剂盒先提取质量和纯度较好的总 RNA,然后使用 Smart cDNA合成试剂盒,同样也获得了高质量的双链 cDNA用于后序实验。该方法不仅所需的 RNA量少,而且也减少了 mRNA的降解,提高了用于建库的 mRNA的质量。此外,在差减效率的检测过程中,试剂盒所提供的检测差减效率的基因是人的管家基因甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)基因,由于该基因与鱼类的同源性不高,因此我们采用的检测指标是在低氧处理前后表达基本无差异的管家基因 β-*actin*,通过不同轮次的 PCR扩增,观察其在等量消减片段库和未削减对照片段库中的相对丰度,从而间接地反映差异表达基因的富集程度。从管家基因 β-*actin*被有效消除的倍数(2^8)来看,差减效率达到了建库的要求。

此外,本实验通过对阳性克隆的筛选、测序和 ESTs同源比对分析,得到了 267个在低氧处理后上调表达的基因($e \leq 0.001$; Identity > 40%)。在这些基因中除了未知基因外,其他基因分别参与糖类代谢、信号传导、细胞防御、细胞凋亡、细胞结构、血管形成与氧气运输、基因表达、细胞增殖等生理生化过程。在这些已知的基因中有 14.6%的基因在哺乳动物或在鱼类中已经被证实为低氧反应基因。从这 267个基因中随机抽取部分基因进行 RT-PCR鉴定,发现这些基因也确实在低氧诱导后上调表达。此外,这些已知基因的变化与鱼类生理变化的结果也是一致的。Johnston, *et al.*[4,5]在分析肌肉中葡萄糖和丙酮酸盐的含量时发现在环境氧浓度降低时欧洲鲫鱼糖酵解过程增强,并指出乙醇是鲫鱼糖酵解的主要终产物,糖酵解过程中产生的 ATP可以在低氧状态下为机体提供能量。Sollid, *et al.*[6,7]发现低氧处理后的欧洲鲫鱼鳃瓣表面积较对照增加了 7.5倍,认为鳃瓣变化的目的是为了增加氧气的摄入量,鳃瓣变化的原因是鳃瓣细胞发生了细胞周期阻滞和细胞凋亡。Fraser, *et al.*[22]利用双向电泳发现鲤鱼在低氧处理后非肌肉组织中肌红蛋白的表达量增加,目的是增加氧气的运输量,保护组织免受低氧损伤。因此从以上结果可以看出该差减 cDNA文库的构建是成功的。该文库的成功构建将有助于下一步克隆鲫鱼抗低氧相关基因,同时也对进一步探讨鱼类抗低氧的分子机制以及研究鱼类细胞与低氧的相互关系有非常重要的意义。

参考文献:

[1] Wu R S S, Zhou B S, Randall D J, *et al*. Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction [J]. *Environ. Sci Technol*, 2003, **37**: 1137—1141

[2] Shang E, Wu R S S. Aquatic hypoxia is a teratogen and affects fish embryonic development [J]. *Environ. Sci Technol*, 2004, **38**: 4763—4767

[3] Schmittou H R. Feed-related problems face China' cage fish culture [J]. *Aquac Asia*, 1996, **1**: 24

[4] Johnston I A. Anaerobic metabolism in the carp (*Carassius carassius* L) [J]. *Comp Biochem. Physiol B*, 1975, **51**: 235—241

[5] Johnston I A, Bernard L M. Utilization of the ethanol pathway in carp following exposure to anoxia [J]. *J Exp Biol*, 1983, **104**: 73—78

[6] Sollid J, De Angelis P, Gundersen K, *et al*. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills [J]. *J Exp Biol*, 2003, **206**: 3667—3673

[7] Sollid J, Kjemsli A, De Angelis P M, *et al*. Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp [J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2005, **289**: R1196—R1201

[8] Kang X L, Yi J. The post-translational chemical modification and its regulating effects on the activity of hypoxia inducible factor-1α [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2006, **18**: 385—390 [康迅雷,易静. 低氧诱导因子-1α的翻译后化学修饰及其对活性的调控作用. 生命科学, 2006, **18**: 385—390]

[9] Qian L J. Genes related to hypoxia adaptation and its research tactics [J]. *China Basic Science*, 2001, **9**: 8—13 [钱令嘉. 低氧适应相关基因及其研究策略的思考. 中国基础科学, 2001, **9**: 8—13]

[10] Sollid J, Rissanen E, Tranberg H K, *et al*. HIF-1*a* and iNOS levels in crucian carp gills during hypoxia-induced transformation [J]. *J. Comp Physiol B*, 2006, **176**: 359—369

[11] Zhang Y B, Gui J F. Identification and expression analysis of two IFN-inducible genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Gene*, 2004, **325**: 43—51

[12] Qiu Z P, Wang C. Suppression subtractive hybridization and it's application [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006, Supplement: 246—250 [邱志鹏,王狮. 抑制消减杂交及其应用. 生物技

术通报, 2006,增刊: 246—250]

[13] Powell W H, Hahn M E. The evolution of aryl hydro-carbon signaling proteins: diversity of ARNT isoforms among fish species [J]. *Mar Environ Res*, 2000, **50**: 39—44

[14] Smith R W, Houlihan D F, Nilsson G E, *et al* Tissue specific changes in RNA synthesis in vivo during anoxia in crucian carp [J]. *Am J Physiol*, 1999, **277**: 690—697

[15] Stecyk J A, Stenslokken K O, Farrell A P, *et al* Maintained cardiac pumping in anoxic crucian carp [J]. *Science*, 2004, **306**: 77

[16] Zhou B S, Wu R S S, Randall D J, *et al* Bioenergetics and RNA/DNA ratio in the common carp (*Cyprinus carpio*) under hypoxia [J]. *J Comp Physiol*, 2001, **171B**: 49—57

[17] Stecyk J A W, Farrell A P. Cardiorespiratory responses of the common carp (*Cyprinus carpio*) to severe hypoxia at three acclimation temperatures [J]. *J Exp Biol*, 2002, **205**: 759—768

[18] Sandblom E, Axelsson M. Effects of hypoxia on the venous circulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comp Biochem Physiol* A, 2005, **140**: 233—239

[19] Gracey A Y, Troll J V, Somero G N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 1993—1998

[20] Ton C, Stamatiou D, Liew C C. Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development [J]. *Physiol Genomics*, 2003, **13**: 97—106

[21] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells [J]. *Acta Hydrobiology Sinica*, 2003, **27**: 113—118 [张义兵,石耀华,桂建芳. 鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 2003, **27**: 113—118]

[22] Fraser J, de Mello L V, Ward D, *et al* Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 2977—2981

CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF THE SUBTRACTIVE cDNA LIBRARY OF CRUCIAN CARP INDUCED BY HYPOXIA

ZHONG Xue-Ping[1, 2], WANG Dan[1], ZHANG Yi-Bing[1] and GUI Jian-Fang[1]

(1. State key laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: Crucian carp (*Carassius auratus* L.) is one of the most anoxia-tolerant vertebrates known. It has been found to survive many days or, at low temperatures, even several months of anoxia in the field and the laboratory. Its adaptive mechanisms surviving anoxia/hypoxia include the ability of promoting anaerobic metabolism to produce ATP, increasing respiratory surface area to boost oxygen uptake, and so on. However, the molecular basis of its response to hypoxia stress has not yet been clarified. In order to analyze the changes of gene expression and isolate those genes induced by hypoxia in blastulae embryonic cells of crucian carp (CAB), a subtrative cDNA library was constructed by using suppression subtrative hybridization techniques.

CAB cells were maintained at 27℃ in a humidified incubator containing 20% O_2. For the hypoxia treatment, cells were placed in a hypoxia chamber containing 1% O_2, 5% CO_2 and 94% N_2 respectively and treated for one hour. Total RNAs were extracted from hypoxia-treated and untreated CAB cells with SV-Total RNA Isolation System. Double-stranded cDNAs were prepared from 0.5μg of total RNA by using SMART cDNA synthesis technique. The subtrative cDNA library was constructed by using suppression subtrative hybridization technique. The subtractive cDNAs were ligated into the pGEM-T vector and transfected into competent *E. coli* cells. A housekeeping gene, β-*actin*, was used to estimate the efficiency of subtractive cDNA and found to be subtracted at appropriate 2^8 folds. 2200 colonies were selected from the plasmid library, and PCR analysis showed that the length of the subtractive cDNA fragments cloned into pGEM-T vector ranged from 100 bp to 2000 bp. Two hundred and sixty-seven genes ($e \leq 0.001$; Identity > 40%) were obtained by sequencing and bioinformatics. Our results showed that the subtractive cDNA library is successful, which will be very useful for the understanding of the response to hypoxia and essential for rapid isolation of differentially expressed genes induced by hypoxia.

Key words: Carassius auratus blastulae embryonic cells; Hypoxia-related gene; Suppression subtrative hybridization