

金鱼头痛形成相关基因差减文库的构建与分析

张运超^{1,2} 何川^{1,2} 顾泽茂^{2,3}

1. 北京市水产技术推广站, 北京 100021; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070;

3. 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 武汉 430070

摘要 采用差减抑制杂交技术(SSH)以1龄红狮头金鱼(*Carassius auratus*)的头痛组织为检测子(Tester), 40日龄红狮头金鱼幼鱼的头顶上皮组织为驱动子(Driver), 构建金鱼头痛相关基因的差减cDNA文库。以鲫管家基因 α -tubulin为参照检测差减效率, 结果表明该文库差减效率达 2^{10} 倍, 效率较高。随机挑选阳性克隆进行接头特异引物的PCR检测, 结果表明插入片段均在0.1~2.0 kb之间。利用斑点杂交对PCR检测结果为单一条带的阳性克隆进行筛选并测序, 获得高差异性的有效序列93条。通过生物信息学方法对文库序列进行比对、分类和注释, 发现若干结缔形成基因和原癌/抑癌基因等与金鱼头痛形成相关的功能基因, 表明cDNA文库构建成功。

关键词 金鱼; 头痛; 差减抑制杂交; cDNA文库

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)01-0085-07

金鱼(*Carassius auratus*)在分类学上属于鲤形目(Cypriniformes)、鲤科(Cyprinidae)、鲫属(*Carassius*), 是我国特有的观赏鱼类^[1]。据考证, 金鱼起源于我国晋代的赤鳞鱼^[2], 经过多年的杂交选育后获得了各种性状的品种, 目前在世界上广泛传播与分布^[3]。头痛类金鱼由于其头顶肉瘤的奇特形状而具特有的观赏价值, 深受养殖者和消费者喜爱, 根据头痛的大小、形状以及分布, 人们将其分为狮头、虎头和高头3个品种。高头是最早出现头痛的金鱼, 其肉瘤仅生长在头顶部位, 如鹤顶红、鹅头红等, 随着高头品种的逐渐退化, 更多更具观赏价值的头痛类金鱼被选育出来, 虎头和狮头是其代表种类。在金鱼的观赏分类中, 通常将无背鳍的蛋种鱼视为虎头金鱼, 其肉瘤均匀分布于整个头部, 如猫狮、寿星等; 而有背鳍的文种鱼则被视为狮头金鱼, 其头痛的分布与虎头相似, 但顶瘤更加发达, 有明显向上突起趋势, 如红狮头等^[4]。

至今, 转基因工程、细胞融合、分子标记等技术已相继用于鱼类的育种研究, 然而对金鱼的选育尚停留于民间爱好者所采用的传统性状杂交选择育种^[5], 这种方式虽能获得较多观赏价值高的品种, 但

针对性和目的性不强, 且耗时、耗材和效率低。尽管许多现代生物学方法已被应用于鱼类育种研究, 但目前对金鱼头痛的认识仅限于王春元等^[6]对金鱼头痛的电镜观察以及王磊^[7]对高头金鱼头痛的组分构成研究, 而对金鱼头痛形成的分子调控机制等方面尚不了解。差减抑制杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)是Diatchenko等^[8]在代表性差异分析(RDA)的基础上发展出的一种分离差异表达基因的有效方法, 具有试验易操作、周期短、假阳性率低等优点, 广泛应用于分离功能基因^[9]。通过SSH方法构建金鱼头痛形成的相关基因cDNA文库不仅能快速鉴定金鱼头痛的发育生长功能基因, 而且克隆的功能基因可以直接应用于金鱼育种的研究探索。

狮头是头痛类金鱼中与鲫亲缘关系最接近的一类, 而红狮头因头痛饱满、色彩鲜艳成为其代表品种。本研究选择红狮头金鱼作为研究材料, 采用SSH方法构建其头痛生长前后差异表达基因的cDNA文库, 筛选金鱼头痛形成的相关功能基因, 旨在为克隆金鱼头痛基因和深入探讨其形成机制积累一定的理论基础, 并为改善传统的金鱼杂交方法, 将

收稿日期: 2013-05-09

基金项目: 现代农业产业技术体系北京市观赏鱼创新项目(pxm2012-036237-000139)

张运超, 硕士研究生, 研究方向: 水生动物医学, E-mail: coolzhang880110@126.com

通信作者: 顾泽茂, 博士, 副教授, 研究方向: 水生生物医学, E-mail: guzema@mail.hzau.edu.cn

分子技术应用于培育具有良好观赏和经济价值的新品种金鱼提供切实可行的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

红狮头金鱼来自中华名塔园(武汉解放大道 1861 号),活体经 M-222 麻醉后解剖,分别取 1 龄红狮头(头瘤已生长完全)的头瘤组织及 40 日龄红狮头金鱼幼鱼(头瘤未开始生长)的头顶上皮组织,经液氮速冻后 -80°C 冻存备用。

双链 cDNA 合成试剂盒 SMARTER PCR cDNA Synthesis Kit、差减杂交试剂盒 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 购自 Clontech 公司; *Taq* DNA 聚合酶、组织 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、pMD-19T 载体、PCR 产物纯化试剂盒购自 TaKaRa 公司;地高辛探针标记试剂盒 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司;其他化学试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 组织总 RNA 提取

组织 RNA 的提取采用 TaKaRa 总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus,取约 0.1 g 组织,按试剂说明进行操作,组织 RNA 以 20 μL RNase-free 水溶解,电泳检测总 RNA 质量并用分光光度计测定浓度, -80°C 保存。

1.3 ds-cDNA 的合成

采用 SMART 的方法合成双链 cDNA。分别取成年红狮头金鱼头瘤组织和 40 日龄红狮头金鱼幼鱼的头顶上皮组织总 RNA 各 1.0 μg 与 1.0 μL CDS 引物混匀,补水到终体积 4.5 μL , 72°C 变性 3 min 后 42°C 保温 2 min,然后在终体积为 10.0 μL 的反应体系中加入 2.0 μL $5\times$ 第 1 链反应缓冲液、1.0 μL SMART II 寡聚核苷酸引物、0.25 μL DTT (20 mmol/L)、0.25 μL RNase Inhibitor、1.0 μL dNTP (10 mmol/L) 和 1.0 μL PowerScript 反转录酶, 42°C 保温 1.5 h 合成第 1 链 cDNA。第 1 链 cDNA 产物 70°C 保温 10 min 终止反应后加入 40.0 μL TE 缓冲液稀释,取 2.0 μL 稀释的第 1 链 cDNA 于 100.0 μL 体系中,加入 2.0 μL PCR 引物、2.0 μL dNTP 和 2.0 μL $50\times$ Advantage cDNA Polymerase Mix 进行第 2 链 cDNA 合成,PCR 反应参数为: 95°C 预变性 1 min; 95°C 15 s, 65°C 30 s, 68°C 6 min,扩增 17 个循环。

1.4 差减抑制杂交

采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) 提供的方法进行差减杂交。首先对双链 cDNA 进行 *Rsa* I 酶切, 37°C 保温 3 h 后对酶切产物进行检测并纯化,将纯化产物的质量浓度调整到 300.0 ng/ μL 。Driver cDNA 的制备在 40 日龄红狮头头顶上皮组织样品酶切纯化后即完成;Tester cDNA 的制备是将 1 龄红狮头的头瘤组织样品酶切纯化后,分成 2 份分别与接头序列 adaptor 1/2R 16°C 过夜连接完成 Tester-1 和 Tester-2 cDNA。将过量的 Driver cDNA 分别加入到 Tester-1 和 Tester-2 cDNA, 98°C 1.5 min 变性后, 68°C 保温 8 h 进行第 1 轮杂交;第 1 轮差减杂交完成后迅速混合 2 份产物并加入新鲜变性的 Driver cDNA, 68°C 保温 12 h 进行第 2 轮杂交。杂交产物稀释后以接头通用引物 primer 1 进行第 1 轮 PCR 扩增,PCR 反应条件为 75°C 5 min,然后 94°C 10 s, 66°C 30 s, 72°C 1.5 min 共 27 个循环;以稀释的第 1 轮 PCR 产物为模板,用接头特异引物 Nested primer 1/2R 进行第 2 轮扩增,PCR 反应条件为 94°C 10 s, 66°C 30 s, 72°C 1.5 min 共 12 个循环。进行差减杂交的同时制备未差减 cDNA。

1.5 接头连接效率和差减效率的检测

为确保建库的效率,用鲫管家基因 α -tubulin 检测接头连接效率和差减效率。以鲫 α -tubulin 的上下游特异引物为一个组合、以及接头引物 PCR primer 1 和 α -tubulin 下游引物为一个组合分别对 Tester cDNA 进行扩增,通过比较扩增产物的产量检测其接头连接效率。PCR 反应条件为 75°C 5 min 延伸末端, 94°C 5 min 预变性, 94°C 30 s, 51°C 30 s, 72°C 1 min,扩增 30 个循环。为确保在 Tester(红狮头金鱼成鱼头瘤组织)和 Driver(40 日龄红狮头金鱼幼鱼头顶上皮组织)样品中的差异表达基因得到有效富集,对鲫 α -tubulin 基因在差减和未差减 cDNA 中表达量的变化进行检测。以差减 cDNA 和未差减 cDNA 为模板,以鲫管家基因 α -tubulin 为指标进行 PCR,分别扩增 18、23、28、33 个循环。PCR 反应条件除没有 75°C 5 min 外,其余接头连接效率相同。鲫 α -tubulin 基因的上下游引物序列分别为:5'-GTGCACTGGTCTTCAGGGGTT-3',5'-GGGAAGTGGATGCGTGGGTAT-3'^[10]。

1.6 差减文库 cDNA 片段大小检测

获得的差减产物经纯化后连接到 pMD-19T 载

体(TaKaRa),转化大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α 感受态细胞,用蓝白斑法挑选颗粒饱满的白色单菌落。随机挑选 500 个单克隆,用接头特异引物 Nested primer 1/2R 扩增检测。PCR 扩增参数为:94 $^{\circ}$ C 15 s,65 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,共 30 个循环。去除产物为多条带的克隆及阴性克隆,扩增产物-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.7 点杂交筛选

为进一步获得高差异表达的阳性克隆,采用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)的方法对阳性单克隆进行进一步筛选。将 Driver cDNA 同样连接接头,但不经差减杂交直接进行 2 轮抑制 PCR 的扩增产物作为对照 cDNA,利用地高辛分别合成差减 cDNA 探针和对照 cDNA 探针。阳性克隆的 PCR 产物经变性后各取 1.0 μ L 固定于 2 张大小相同的正电荷尼龙膜相同位置,分别与差减 cDNA 和对 cDNA 探针 40 $^{\circ}$ C 过夜杂交,利用试剂盒的 NBT/BCIP 系统显色。比较 2 张膜相同位置的信号强度,取杂交信号仅在用差减 cDNA 探针杂交时出现或信号强度明显高于对照 cDNA 探针者为阳性克隆。

1.8 差减 cDNA 文库的测序及比对分析

对筛选得到的阳性克隆交由上海生工生物工程公司测序,去除载体和接头序列后在 NCBI 上进行 Blast X 比对,利用 Blast2GO 软件对文库序列进行分类注释^[11-12],在 Uniprot 数据库中(<http://www.uniprot.org>)对已知或已命名的基因进行功能分析和预测^[13]。

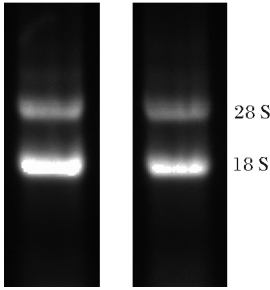
2 结果与分析

2.1 总 RNA 的鉴定

红狮头金鱼成鱼的头瘤组织及 40 日龄红狮头金鱼幼鱼头顶上皮组织总 RNA 提取结果见图 1。 D_{260}/D_{280} 比值均在 1.8~2.0 之间;电泳条带清晰,28S、18S 比例约为 2:1,总 RNA 样品质量达到建库要求。

2.2 SMART cDNA 的合成

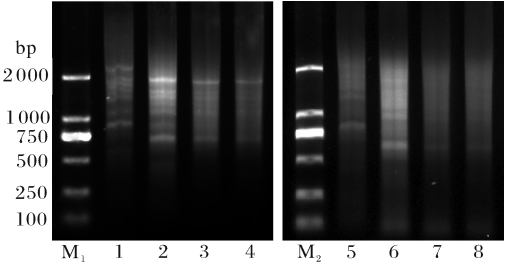
红狮头金鱼成鱼的头瘤组织及 40 日龄红狮头金鱼幼鱼头顶上皮组织的总 RNA 样品按 SMART 方法合成双链 cDNA,结果见图 2。其中 LD-PCR 第 2 链扩增的 PCR 最佳循环数均为 17。



1:1 龄红狮头金鱼头瘤组织的总 RNA;2:40 日龄红狮头金鱼头顶上皮组织的总 RNA。1:Total RNA from wen tissue of 1-year oranda;2:Total RNA from epithelial tissue on the head of 40-days oranda.

图 1 总 RNA 提取结果

Fig.1 Extraction results of total RNA



M_1/M_2 :DL 2 000 DNA 标准分子质量;1~4:成年红狮头金鱼头瘤在 15、18、21、24 个循环时的 SMART cDNA;5~8:红狮头金鱼幼鱼头顶上皮组织在 15、18、21、24 个循环时的 SMART cDNA。 M_1/M_2 :DL 2000 DNA marker;1-4:Smart cDNA from wen of 1-year oranda at 15,18,21 and 24 cycles respectively;5-8:Smart cDNA from epithelial tissue on the head of 40-days oranda at 15,18,21 and 24 cycles respectively.

图 2 双链 cDNA 合成结果

Fig.2 Synthesize results of ds-cDNA

2.3 Rsa I 酶切及接头连接效率检测

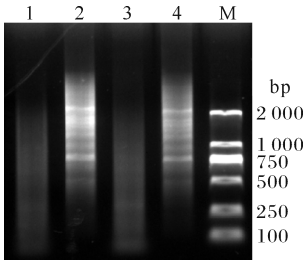
对所合成的双链 cDNA 进行 *Rsa* I 酶切,使 cDNA 片段长度均一化且两端都具有粘性末端。经 3 h 酶切后,cDNA 片段酶切完全,其中较亮的条带对应于高丰度 mRNA(图 3)。

分别以 Tester-1 和 Tester-2 为模板,用 α -tubulin 下游特异引物和 PCR primer 1 进行扩增,所获得的产物在亮度上与用 α -tubulin 上下游特异引物所扩增的产物相比差异在 4 倍以内,说明 25% 以上的 cDNA 已经连上了相应的接头序列,满足后续试验的要求(图 4)。

2.4 差减文库差减效率的检测

经差减和未经差减的 cDNA 同时进行 2 轮抑制 PCR,结果见图 5。与未差减 cDNA 相比,差减

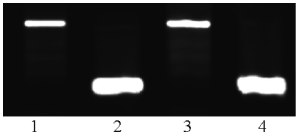
cDNA 的 2 次 PCR 产物中均在背景拖带上出现了一些较明显的亮带,表明经过差减抑制杂交后一些 Tester-cDNA 中的差异表达基因得到了有效富集。差减 cDNA 的第 2 次 PCR 产物主要集中在 200~1 000 bp,与酶切产物条带一致,表明 *Rsa* I 酶切以及接头连接的效率较高。



M:DL 2 000 DNA 标准分子质量; 1~2:1 龄红狮头金鱼头瘤 cDNA 酶切前后; 3~4:40 日龄红狮头金头顶上皮组织 cDNA 酶切前后。M:DL 2 000 DNA marker; 1-2:cDNA from wen of 1-year oranda before and after digestion, respectively; 3-4: cDNA from epithelial tissue on the head of 40-days oranda before and after digestion, respectively.

图 3 *Rsa* I 酶切结果图

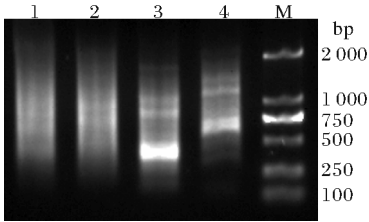
Fig. 3 The results of *Rsa* I digestion



1/3:PCR Primer 1 和 α -tubulin 的下游引物的 PCR 产物; 2/4: α -tubulin 上游和下游引物的 PCR 产物。1/3:PCR product amplified by PCR Primer 1 and α -tubulin downstream primer; 2/4: PCR product amplified by α -tubulin upstream primer and downstream primer.

图 4 Tester cDNA 接头连接效率检测

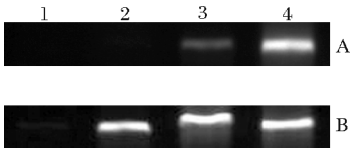
Fig. 4 Results of the adaptor ligation efficiency analysis



M:DL 2 000 DNA 标准分子质量; 1:未差减 cDNA 第 2 次 PCR 产物; 2:未差减 cDNA 第 1 次 PCR 产物; 3:差减 cDNA 第 1 次 PCR 产物; 4:差减 cDNA 第 2 次 PCR 产物。M:DL 2 000 DNA marker; 1:2nd PCR products of unsubtracted cDNA; 2:1st PCR products of unsubtracted cDNA; 3:2nd PCR products of subtracted cDNA; 4:1st PCR products of subtracted cDNA.

图 5 以差减和未经差减 cDNA 为模板的 2 次 PCR 产物
Fig. 5 The 1st and 2nd PCR products of both subtracted and unsubtracted cDNA

以未差减 cDNA 为模板,鲫管家基因 α -tubulin 经 18 个循环扩增就可见扩增条带;以差减 cDNA 为模板, α -tubulin 经过 28 轮循环出现条带。 α -tubulin 在差减 cDNA 和未差减 cDNA 中含量出现显著差异,表明经过差减抑制杂交,已经成功将样品中管家基因 α -tubulin 的拷贝数降低了 2^{10} 倍,反过来说明某些差异表达的基因可能富集了 2^{10} 倍(图 6)。



A:以差减 cDNA 为模板扩增 Amplification using subtracted cDNA as the template;B:以未差减 cDNA 为模板扩增 Amplification using unsubtracted cDNA as the template. 1~4:差减 cDNA 和未差减 cDNA 用 α -tubulin 引物进行扩增,分别在 18、23、28、33 个循环时的 PCR 产物 PCR products of subtracted cDNA and unsubtracted cDNA at 18,23,28 and 33 cycles, respectively.

图 6 PCR 检测 α -tubulin 的差减效率

Fig. 6 Subtraction efficiency of α -tubulin cDNA detected by PCR

2.5 PCR 筛选

随机挑选 500 个克隆用接头特异引物 Nested Primer 1/2R 进行 PCR 检测。弃阴性克隆和产物为多条带的克隆,得到 PCR 产物为单一条带的有效克隆近 400 个,插入片段在 0.1~2.0 kb 之间,部分鉴定结果见图 7。



图 7 差减 cDNA 质粒文库中插入 cDNA 片段大小的鉴定
Fig. 7 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA library

2.6 点杂交筛选

将差减 cDNA 和未差减 cDNA 探针分别和单克隆 PCR 产物进行点杂交,对比 2 张尼龙膜相同位置的杂交信号,取杂交信号仅在差减 cDNA 探针杂交时出现、或信号强度明显高于用未差减 cDNA 探针杂交 5 倍以上者为阳性克隆,得到可用于进一步筛选的克隆 116 个(图 8)。

2.7 测序及序列分析

将从差减文库中筛选得到的阳性克隆进行测序,最终得到 93 条有效序列。将所得的序列用 Blast X 比对,其中 60 条序列(64.5%)与功能已知的基因具有同源性(E value $\leq 10^{-5}$),15 条序列

(16.1%)与功能未知基因具有同源性,18 条序列 (19.4%)为未知基因。通过 GO(gene ontology)及 Uniprot 数据库对已知或已命名的基因进行注释分

析,发现这些基因涉及代谢、细胞粘附、信号传导、免疫、细胞凋亡、细胞结构、细胞增殖等多个生物学过程(图 9)。

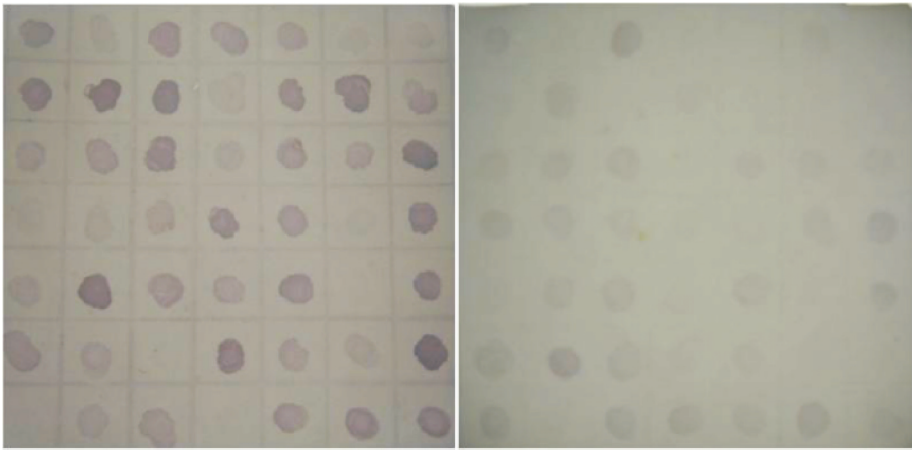


图 8 斑点杂交筛选含有差异 cDNA 片段的克隆

Fig.8 Screen of colonies with differential cDNA fragment from subtractive cDNA library by dot blot analysis

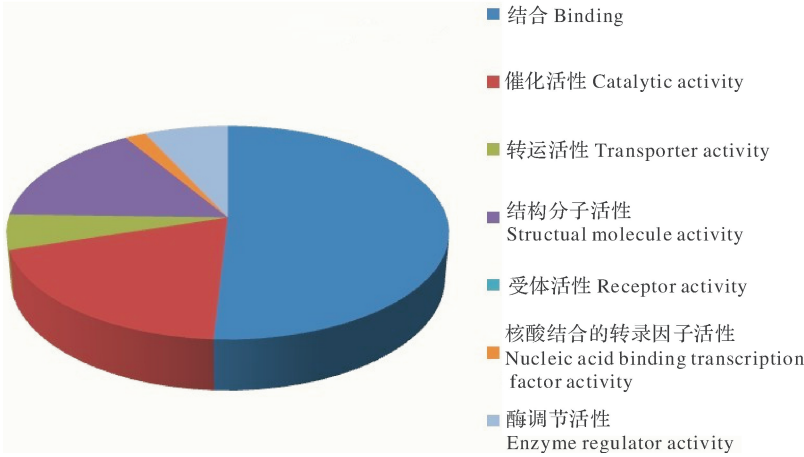


图 9 文库 EST 序列功能分类

Fig.9 Classification of the differentially expressed ESTs in the functional categories

3 讨 论

金鱼外部形态的变化离不开环境的改变,自晋朝发现赤鳞鱼以来,金鱼经历了由野生状态过渡到家化的过程,生存环境也由野外河流池塘进入个人庭院^[14]。作为金鱼标志性状的一种,头瘤的出现也是人工选育的产物,头瘤的 3 种形态(细瘤、整瘤、块瘤)配合 3 大块瘤(顶瘤、鳃瘤、吻瘤)的不同组合形成了品色各异的头瘤^[4]。目前已有研究表明有背鳍的红狮头金鱼与鲫的亲缘关系最为接近^[2]。因此,本研究选用红狮头金鱼的头瘤组织作为研究对象;金鱼头瘤开始生长的时间根据品种的不同有所区

别,而红狮头金鱼的头瘤在 2 月龄时才开始生长^[4]。因此,本研究选取 40 日龄的红狮头金鱼幼鱼作为对照 Driver,这时的金鱼幼鱼已初具鱼体形态,而头瘤在一段时间之后才会开始生长。我们通过差减抑制杂交技术构建了关于金鱼头瘤相关基因的差减 cDNA 文库。

在构建差减 cDNA 文库的过程中,双链 cDNA 的质量、接头连接效率和差减效率决定着 cDNA 文库的质量^[8]。获得双链 cDNA 的传统方法需要从总 RNA 中分离 mRNA,但我们在实际操作过程中发现头瘤组织的 RNA 丰度较低,而金鱼幼鱼头顶上皮组织的取样量也非常少,若按传统的方法耗时

长、耗材多,因此,在本试验中改用 SMART 方法,用总 RNA 直接合成高质量的双链 cDNA。这种方法不仅所需的 RNA 用量少,也减少了 mRNA 在操作过程中的损耗,更利于 cDNA 文库的构建。在检测接头连接效率和差减效率时,试剂盒所提供的 G3PDH 引物序列仅适用于人和小鼠,与鱼类基因的同源性不高。因此,本试验改用鲫管家基因 α -tubulin 的特异引物来进行检测^[10]。在进行接头效率检测时,用恒温培养箱进行接头连接的效果明显优于 PCR 仪,这可能是由于 PCR 仪对温度的恒定效果欠佳所致。对经过差减和未经过差减的第 2 次抑制 PCR 产物进行比较可以对文库差减效率进行初步的判断,而进一步检测是通过观察管家基因在差减产物和未差减产物中的相对丰度来判断^[8]。经过 2 轮差减杂交, α -tubulin 在 cDNA 中的相对丰度被有效降低了 2^{10} 倍,反过来某些差异表达的基因可能富集了 2^{10} 倍,说明差减杂交效率达到建库的要求。

通过 Blast 同源比对分析和 GO 注释的结果,文库中基因主要涉及以下几类功能:防御类,信号转导,转运类以及能量代谢、转录调节、蛋白结合等,这些结果表明金鱼头瘤的形成涉及到一系列复杂的生物学功能。根据已有的报道,头瘤组织的出现与金鱼头顶上皮组织的变异有关^[4,6],在组织切片中也观察到了大量的结缔组织^[7],而在本研究构建的文库中也发现了一些与结缔组织相关的基因。此外,在文库中还出现了若干原癌/抑癌基因,这说明金鱼头瘤的形成可能还涉及到细胞增殖、粘附性降低等与恶性肿瘤相关的生物学过程^[15-18]。

金鱼性状的产生离不开变异^[13],而金鱼头瘤的形成并非单一的良性肿瘤或结缔增生。根据已有的研究,我们认为金鱼头瘤的形成可以分为 2 个阶段。明代后期盆养被广泛应用于金鱼的养殖,在这种静态的生活环境下金鱼摄食得到充分保障^[4],头部皮肤不用再面对强劲的水流,头顶上皮组织逐渐退化解体,发生的变化包括细胞不断分裂增生、细胞间粘附性降低等,这个阶段的金鱼头瘤可以被视为一种良性肿瘤。随后大量结缔组织和黏液在金鱼头部表皮的下层细胞积聚,细胞间隙增大,最终导致金鱼头顶不断隆起,这一阶段与王春元等^[6]研究结果一致,也是金鱼头瘤形成的主要原因。金鱼头瘤相关基因 cDNA 文库的成功构建将有助于克隆金鱼头瘤相关基因,同时也对进一步探讨其头瘤形成的机制以及将分子技术应用于金鱼育种具有非常重要的意义。

致 谢 中华名塔园的张良玉先生提供了试验过程中所需的各时期红狮头金鱼,并对试验中出现的问题提出了许多建议,在此对张良玉先生表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 梁前进. 金鱼起源及演化的研究[J]. 生物学通报, 1995, 30(3): 14-16.
- [2] TOMOYOSHI K, HIROYUKI K, YOSHI T, et al. An evolutionary origin and selection process of goldfish [J]. Gene, 2009, 430(1/2): 5-11.
- [3] 潘吉星. 金鱼在中国的家养史及其在东西方的传播[J]. 自然杂志, 2008, 30(5): 287-290.
- [4] 曹峰. 金鱼头瘤考[J]. 水族世界, 2011(3): 114-121.
- [5] 赵朝阳, 殷缘, 祁旭文, 等. 中国金鱼品种选育的研究进展[J]. 生物学通报, 2010, 45(11): 7-11.
- [6] 王春元, 李延龄. 我国现有的金鱼品种的分类及其系统发育的探讨[J]. 动物学报, 1983, 29(3): 267-277.
- [7] 王磊. 金鱼(*Carassius auratus*)头瘤的生化组成及组织学研究[D]. 上海: 上海海洋大学水产与生命学院, 2009.
- [8] DIATCHENKO L, LAU Y F, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025-6030.
- [9] 程起群. 抑制消减杂交(SSH)及其在鱼类基因克隆中的应用[J]. 水产学报, 2004, 28(3): 323-328.
- [10] 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[J]. 水生生物学报, 2003, 27(2): 113-118.
- [11] CONESA A, GOTZ S, TEROL J, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. Bioinformatics, 21(18): 3674-3676.
- [12] YE J, FANG L, ZHENG H, et al. WEGO: a web tool for plotting GO annotations [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(2): 293-297.
- [13] BAIROCH A, APWEILER R, WU C H, et al. The universal protein resource (UniProt) [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33(1): 154-159.
- [14] 王春元. 金鱼外部形态的变异[J]. 生物学通报, 2008, 43(9): 1-3.
- [15] WILLECKE M, HAMARATOGLU F, KANGO-SINGH M, et al. The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size [J]. Curr Microbiol, 2006, 16(21): 2090-2100.
- [16] JIANG C G, LYU L, LIU F R, et al. Connective tissue growth factor is a positive regulator of epithelial - mesenchymal transition and promotes the adhesion with gastric cancer cells in human peritoneal mesothelial cells[J]. Cytokine, 2013, 61(1): 173-180.
- [17] HERLYN H, ZISCHLER H. Identification of a positively evol-

ving putative binding region with increased variability in posttranslational motifs in zonadhesin MAM domain 2 [J]. Mol Phylogenet Evol,2005,37(1):62-72.

[18] COZZI V,GARLANDA C,NEBULOMI M,et al. PTX3 as a potential endothelial dysfunction biomarker for severity of pre-eclampsia and IUGR [J]. Placenta,2012,33(12):1039-1044.

Construction and analysis of subtractive cDNA library
of goldfish wen-related genes

ZHANG Yun-chao^{1,2} HE Chuan^{1,2} GU Ze-mao^{2,3}

1. Beijing Fisheries Technology Extension Station, Beijing 100021, China;
2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China

Abstract Goldfish (*Carassius auratus auratus*) are the most important ornamental fish and have closely genetic relationship with *Carassius auratus*. Some goldfish have obvious and beautiful oranda wen. However, how the oranda wen forms and grows is remained unknown. In this study, suppression subtractive hybridization (SSH) strategy was employed to construct a cDNA library that represented genes related to the wen. Wen tissue of 1-year oranda goldfish was treated as the tester and epithelial tissue on the head of 40-days oranda fry was treated as the driver. The housekeeping gene α -tubulin was used to detect the efficiency of the library and the α -tubulin mRNA expression decreased by up to 2^{10} -fold in the subtracted libraries compared with the un-subtracted samples, indicating a high subtractive efficiency. The result of nested PCR with adapter specific primers showed that the length of the inserts ranged from 100 bp to 2 000 bp. A total of 93 effective sequence with high otherness were identified by dot-blot screen and sequencing. ESTs in the library were compared, classified and annotated to common data base by bioinformatics analysis, and a set of special genes such as connective related genes and tumor-related genes, which could be involved in wen formation process of oranda goldfish, were identified, indicating that the cDNA library was constructed successfully.

Key words goldfish; wen; suppression subtractive hybridization; cDNA library

(责任编辑:边书京)