

文章编号:1000 - 0615(2006)02 - 0204 - 07

## 抑制差减杂交法克隆牙鲆变态早期差异表达的基因

鲍宝龙<sup>1,2</sup>, 杨桂梅<sup>1</sup>, 施志仪<sup>1</sup>, 任大明<sup>2</sup>

(1. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

2. 复旦大学遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

**摘要:**为了克隆变态早期牙鲆头部差异表达的基因,采用抑制差减杂交法,以变态前的仔鱼头部表达的 RNA 作为驱动 RNA,建立了牙鲆变态早期的差减 cDNA 文库,并利用相对定量 RT-PCR 对其进行了筛选。差减库的平均插入片段 558 bp 左右,阳性率为 81.8%。随机测定的 45 个克隆,在剔除假阳性克隆后,共得到 22 个不同的基因,其中 13 个为已知 cDNA 的同源基因,而另外 9 个为已知蛋白的同源基因,分别为 prolactin receptor-like, COL1A1, M3-muscarinic receptor, *Sfn3*, tropomyosin, ribosomal protein L27, ribosomal protein S12, *GAPDH*, COL1A3。在所有 22 个基因中, COL1A1 基因在差减库中的分布频率最高,为 22.2%。RT-PCR 检测结果表明,在所检测的 11 个基因中,所有基因在右眼移动前后的牙鲆头部均有表达,只是体现在表达水平上的不同。

**关键词:**抑制差减杂交;牙鲆;变态早期;变态前;差异表达;相对定量 RT-PCR

中图分类号:Q344+.13;S917 文献标识码:A

## Differential expression genes cloned in pro-metamorphosing *Paralichthys olivaceus* by suppression subtractive hybridization

BAO Bao-long<sup>1</sup>, YANG Gui-mei<sup>1</sup>, SHI Zhi-yi<sup>1</sup>, REN Da-ming<sup>2</sup>

(1. College of Aquaculture Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China;

2. The State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai, 200433, China)

**Abstract:** To clone the differential expression genes between the pre-metamorphosis (17 day post hatching, DPH) and pro-metamorphosis stage (23 DPH), we used suppression subtractive hybridization (SSH) to construct a cDNA library of pro-metamorphosis flounder *Paralichthys olivaceus*, when the RNA from pre-metamorphosis larvae was used as the driver. The lengths of inserted cDNA fragments in the library ranged from 215 to 774 bp, and the average length was about 558bp, which is much close to the cut frequency of restrict endonuclease *Rsa* I. The percentage of positive clones in the SSH library was 81.8%. Total 45 clones were sequenced randomly. Using relative quantitative RT-PCR to check the gene expression level, we thought that the positive clones should express at higher level in pro-metamorphosis flounder than that in pre-metamorphosis larvae, otherwise, they should be regarded as false positive clones. Total 22 genes represent positive clones including 13 homologue genes with unknown proteins, of which most have high similar sequences with other organisms, and 9 homologue genes with known proteins like prolactin receptor-like, COL1A1, M3-muscarinic receptor, *Sfn3*, tropomyosin, ribosomal protein L27, ribosomal protein S12, *GAPDH*, COL1A3. Among all the 22 positive genes, the frequency of COL1A1 clone was highest as 22.2%, the prolactin receptor-like was next to the highest as 8.9%, most genes distributed with lowest frequency 2.2% in SSH cDNA library. The results of RT-PCR showed that the 11 representative genes all expressed in the heads of pre-metamorphosis and pro-metamorphosis flounder larvae.

收稿日期:2005-04-11

资助项目:上海市教委重点学科项目(Y1101);农业部“948”引进项目(2004-Z44);上海市教委发展基金项目

作者简介:鲍宝龙(1970-),男,浙江临海人,博士,主要从事鱼类学和发育生物学研究。Tel:021-65710024, E-mail:blbao@shfu.edu.cn

cn

通讯作者:任大明, Tel:021-65642506, E-mail:dmren@fudan.edu.cn

**Key words:** suppression subtractive hybridization (SSH); *Paralichthys olivaceus*; pro-metamorphosis; pre-metamorphosis; differential expression; relative quantitative RT-PCR

自首次报道牙鲈变态过程的眼睛迁移受甲状腺激素控制以来<sup>[1]</sup>,在鲈形目的其他鱼类中也同样证实了甲状腺激素的这种作用<sup>[2]</sup>。围绕目前已知的甲状腺激素调控途径开展的研究<sup>[3,4]</sup>,至今不能解释眼睛移动的机制,也没有明确的与眼睛迁移相关的基因。牙鲈眼睛移动造成的左右不对称的机制也已被证明不同于脊椎动物内脏左右不对称的信号调控途径,牙鲈眼睛移动可能不同于目前所知的任何机制<sup>[5]</sup>。因此,利用目前已知的理论很难克隆到与牙鲈眼睛移动相关的基因。

抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是目前克隆差异表达基因的主要方法之一,由于 SSH 法能富集低丰度的 mRNA,所以能克隆出功能上极为重要的基因<sup>[6]</sup>。在国外,关于 SSH 法克隆基因已有很多的报道<sup>[7-9]</sup>。目前国内在植物和医学上有一些报道<sup>[10]</sup>,但在国内的水产动物中还很少报道。为了寻找与眼睛移动相关的基因,本研究利用抑制差减杂交法,建立牙鲈眼睛移动前与眼睛移动开始时的差异表达的 cDNA 文库,为下一步筛选与眼睛移动相关的基因奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 仔鱼饲养

孵化后 17 d 牙鲈仔鱼购自中国水产科学院北戴河增殖中心。仔鱼饲养在 80 L 的塑料缸中,水温控制在(20 ± 0.5) °C,用刚孵化的卤虫无节幼体投喂,饵料密度维持在每毫升 5 个。牙鲈变态早期指的是从眼睛开始移动到冠状幼鳍开始缩短<sup>[11,12]</sup>,本实验中以孵化后 23 d 仔鱼代表变态早期,而以孵化后 17 d 仔鱼代表变态前。

### 1.2 总 RNA 抽提

为防止肠道内食物的基因污染,只提取仔鱼头部的总 RNA。把 100 mg 仔鱼头部与 1 mL 的 Trizol™试剂(Gibco 公司)移入冰上匀浆器中匀浆,匀浆液中加入 0.2 mL 氯仿,4 °C 下 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min;在转移的液相中加入 0.5 mL 的异丙醇,室温下放置 10 min 后,4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,倒掉上清,用 75%酒精洗涤后自然凉干,加入适量 0.1% DEPC 去离子水溶解,

置于 -70 °C 保存。总 RNA 经过紫外分光光度计(Pharmacia 公司)确定浓度和纯度。

### 1.3 mRNA 纯化

按照 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia 公司)说明书操作。把溶解在洗脱液中的 1 mg 总 RNA 加入洗脱柱,350 g 离心 2 min;然后在洗脱柱中加入 0.25 mL 高盐缓冲液,350 g 离心 2 min;重复上一步;加 0.25 mL 低盐缓冲液,350 g 离心 2 min,350 g 离心 2 min;重复上一步骤 2 次;加 0.25 mL 6S 的洗脱液,350 g 离心 2 min;重复以上步骤 3 次;收集所有洗脱下来的 mRNA。经紫外分光光度计确定 mRNA 浓度和纯度。

### 1.4 抑制差减杂交

主要按照 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech 公司)说明书进行。在正向差减杂交中,以 23 d 仔鱼作为目标 RNA (tester),而以 17 d 仔鱼(变态前)作为驱动 RNA (driver);在反向差减杂交中,正好相反。第 1 次 PCR 的反应条件为:75 °C 5 min,94 °C 2 min,35 个循环中,94 °C 40 s,64 °C 40 s,72 °C 1.5 min;72 °C 延伸 4 min;第 2 次 PCR 反应条件:94 °C 2 min,18 个循环,94 °C 40 s,66 °C 40 s,72 °C 1.5 min;72 °C 延伸 4 min。

### 1.5 差减库的建立(T/A 克隆法)

分别从第 2 次 PCR 扩增后的正向和反向差减 PCR 产物中(共 25 μL)取出 12 μL,与 1.5 μL 的 GEM-T 载体 4 °C 下连接。从连接体系中(共 40 μL)取出 20 μL 转化受体菌 DH5,采用 Xgal/IPTG 筛选克隆。

### 1.6 测序和序列分析

从正向差减库中(变态早期)总共挑选了 776 个阳性克隆,从反向差减库中(变态前)总共挑选了 453 个阳性克隆,逐个编号,然后用 50%甘油于 -20 °C 保存。从正向差减库中随机挑选了 45 个克隆,接种于液体 LB 中 37 °C 培养过夜,质粒抽提,送博亚公司测序。通过利用 BLASTx 搜索 GenBank,来确定同源基因。

### 1.7 相对定量 RT-PCR

为了评估差减库的阳性率,采用 RT-PCR 比较基因在变态早期和变态前的表达差异。设计部分基因的特异性引物,分别对 17 d 和 23 d 仔鱼进

行相对定量 RT-PCR 检测,以确定各基因在此两期的表达量的差异。相对定量 RT-PCR 参照 QuantumRNA™ Universal 18S Internal Standard 试剂盒(Ambion 公司)的使用说明。17 d 和 23 d 仔鱼总 RNA 的量均为 1 μg,采用随机引物通过 M-MLV 逆转录酶合成第一条链。PCR 反应体系(50 μL): 1 μL 单链的 cDNA, 5 μL 10 × PCR buffer, 4 μL 2.5 mmol L<sup>-1</sup> dNTP, 各 2 μL 的目标基因的引物,4 μL 18S rRNA 引物和 18S rRNA 竞

争性引物,0.25 μL Taq 酶。不同基因的 PCR 反应条件有所不同,95 5 min,N 个循环中 94 1 min,退火温度 1 min,72 1 min。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳,所有 PCR 产物的上样体积为 15 μL,相同厚度的凝胶,相同的曝光时间拍照。由于内标的 18S rRNA 的 PCR 扩增长度为 360 bp,所以目标基因的扩增长度不要大大超过此长度,否则,目标基因的片段很难扩增成功。不同克隆的引物和 PCR 反应条件见表 1。

表 1 不同克隆的引物和相对定量 RT-PCR 反应条件

Tab. 1 The specific primers and reaction conditions in relative quantitative RT-PCR

克隆 clones	引物序列(5'-3') primer sequences	产物(bp) production	循环数 cycles	18S 引物 18S primer	18S 竞争性引物 competitor	退火温度(°C) annealing temp.
G65	CATCTCCGTCCTCCAGTCTATGAAGCC GCATTACTGACGATGGTCA TGGAGGAG	234	23	3	7	64
A4	TGGACTTGAAA TTGTTGTGTGTGTGT AAAGGTAGTGGTCCAAACACGATGATG	249	23	3	7	64
B22	ACAAGAA TTTCTTCGCCGCCTGTG TTGTCA GTGAGTGCTCTGGCACCAG	163	23	3	7	66
B78	TAAGAAGTGT TTTGGGTAGCCAGGAA TCCAC ACGCGTAGTTTACAGCCACACATGTTTCTC	127	25	2	8	66
F68	CACCGCAAGTGC TTCTAGAGGAAGAAAAG CGAAGTTCACCAACACACAGTTCAGGTC	296	25	3	7	64
F20	CCTTGT CAGAAAA TGCA TCCAGCTG CCACATGCACATGAGGCTCAAAGTC	223	25	3	7	64
A7	GTGAA TGTCTGGCACA TGGCAATC CAGAA TCCACACAGGGCCGC	432	25	2	8	66
C41	TCGTAGCGACGCTCTGCGGTTAC ACGTCGTCCGCTGTCTAACAGGTC	229	28	2	8	64
C27	CCGACTCTCTCCTCGA TGTGAGAACAC CTGGTCCCTGTGGACTGACGTA TTG	186	25	3	7	66
F18	CCTGACCTTGGACTAAGGGAGAGACCG GTTTGGCGATTCTCTCCAGAAAAGAAC	201	27	2	8	64
H59	GACACTTGTATA TTGTACAGTTTGTGAGTGGAC CTCCAGGCACAAAAGCCGTAATAGCATC	201	25	2	8	64

## 2 结果

### 2.1 正向差减库的插入片段的长度分布

通过第二轮 PCR 差减,可以看到正向和反向差减库中插入片段的长度在 200 ~ 1200 bp 之间,而主要集中在 600 bp 左右(图 1)。正向的 PCR 产物中还有几个特别亮的条带,表明在变态早期的仔鱼有些基因的表达量比变态前的仔鱼可能有明显的增加。参考随机测序的克隆的序列长度,也分布在 215 ~ 774 bp 之间(表 2)。结合相同序列的克隆在正向差减库中的出现频率,可以初步估算插入片的平均长度为 558 bp。根据抑制差减方法的原理,600 bp 左右的核苷酸长度与 *Rsa* I 酶切位点分布频率是相似的。

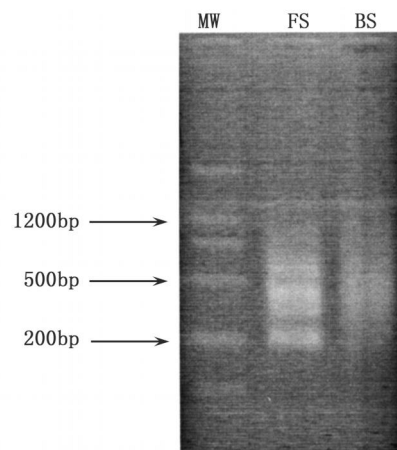


图 1 第二轮 PCR 差减的电泳图

Fig. 1 The result of second PCR subtractive  
FS 指正向差减;BS 指反向差减  
FS, forward subtractive; BS, backward subtractive

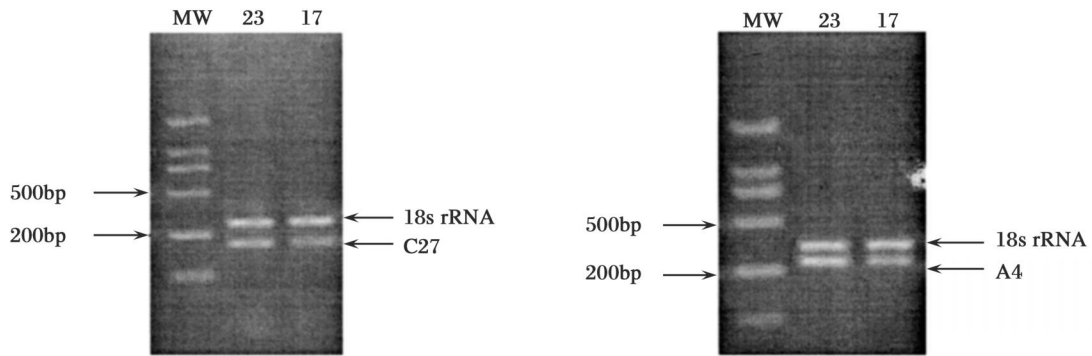


图2 克隆 C27 和 A4 的半定量 RT-PCR

Fig. 2 The relative quantitative RT-PCR of representative clone C27 and A4  
 23. 孵化后 23 d 的仔鱼; 17. 孵化后 17 d 的仔鱼  
 23. larvae of 23 days after hatching; 17. larvae of 17 days after hatching

## 2.2 正向差减库的基因的分布频率

共随机挑选了正向差减库中的 45 个克隆进行了测序,代表了 24 个不同的基因(表 2)。其中 COL1A1 (collagen, type I, alpha 1) 基因分布频率最高(22.2%),共有 17 个基因为单个克隆分布,

表明正向差减库是经过驱动 RNA(变态前)比较充分的差减。在 24 个基因中,所有的基因在 GenBank 中都有同源基因。其中有 11 个基因为已知蛋白的基因,而其余 13 个为未知蛋白的基因,分别占基因总数的 45.8% 和 54.2%。24 个基因都已提交 GenBank,接受号见表 2。

表 2 正向差减库(23 dph)中随机测序的克隆和长度

Tab. 2 Randomly sequenced clones and their length in the forward subtractive library (23 dph)

克隆 clones	相同序列克隆 clones with same seq.	GenBank 接受号 GenBank Acce. No.	同源基因和 Genbank 接受号 Homologue gene & Acce. No.	同源基因的物种 species	出现频率 (%) frequency	序列长度 (bp) seq. length
H59	C4	A Y966462	BJ494626	<i>Oryzias latipes</i> *	4.4	404
H15	A2, E93, C96	A Y966463	prolactin receptor-like, A Y251295	<i>Haplochromis</i> * sp.	8.9	774
F18	B99, A12, A14	A Y966464	AU083140	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	8.9	503
B22	H39, F9	A Y966465	Parvalbumin, CR734804	<i>Tetraodon nigroviridis</i> *	6.7	573
A11	F2, A6	A Y966466	CX806120	<i>Xenopus tropicalis</i>	6.7	608
A4	C28, G38, C2, C57, E35, A24, G59, A18, C8	A Y966467	Collagen type I alpha 1 (COL1A1), AB196513	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	22.2	742
D64	A29	A Y966468	ribosomal protein S12 NM-200046	<i>Danio rerio</i> *	4.4	232
A7		A Y966469	BJ701473	<i>Haplochromis</i> * sp	2.2	721
A15		A Y966470	CR926381	<i>Xenopus tropicalis</i>	2.2	629
A27		A Y966471	CNS0GF8	<i>Tetraodon nigroviridis</i> *	2.2	690
A30		A Y966472	BX470172	<i>Danio rerio</i> *	2.2	221
A40		A Y966473	AL844869	Mouse	2.2	558
B9		A Y966474	m3 muscarinic receptor, AF331832S3	<i>Homo sapiens</i>	2.2	324
B78		A Y966475	Sfn3 (A Y197342)	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	2.2	276
C27		A Y966476	AC131189	<i>Mus musculus</i>	2.2	640
C39		A Y966477	XM-327198	<i>Neurospora crassa</i>	2.2	280
C41		A Y966478	AL827652	<i>Triticum aestivum</i>	2.2	569
E20		A Y966479	tropomyosin, AB045645	<i>Pennahia argentata</i> *	2.2	215
E94		A Y966480	ribosomal protein L27 C82059	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	2.2	464
G65		A Y966481	GA PDH, AF123727	<i>Astatotilapia burtoni</i> *	2.2	602
F20		A Y966482	AC139993	<i>Mus musculus</i>	2.2	584
F68		A Y966483	AU050214	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	2.2	385
F94		A Y966484	AW013558	<i>Pseudopleuronectes americanus</i> *	2.2	222
F98		A Y966485	Collagen type I alpha 3 (COL1A3), NM-201478	<i>Danio rerio</i> *	2.2	410

注: \*指鱼类

Notes: \* means Teleostei

### 2.3 正向差减库克隆的阳性率

建立差减库的目的是筛选差异表达的基因,在本实验中,对 24 个基因中的 11 个进行了相对定量的 RT-PCR 检测。所检测的 11 个基因在变态前和变态早期都有不同程度的表达(表 3,图

2)。如果某基因在变态早期的表达水平要高于变态前,可以说明其在正向差减库中为阳性克隆,反之,为假阳性。在本研究的所检测的 11 个基因中,有 9 个为真阳性,阳性率为 81.8%(表 3)。

表 3 利用相对定量 RT-PCR 随机检测各基因在孵化后 23 d 和 17 d 的仔鱼头部的表达水平

Tab. 3 Differential expression levels of random selected genes in 23dph and 17dph larvae using relative quantitative RT-PCR

代表性基因 representative genes	对应的克隆 corresponding clones	17 d 仔鱼 17 d larvae	23 d 仔鱼 23 d larvae	PCR 产物(bp) PCR production	阳性确定 positive or false
<i>GA PDH</i>	G65	0.819	1.163	234	阳性 positive
<i>COL1A1</i>	A4	0.895 *	1.097 *	249	阳性 positive
Parvalbumin	B22	1.286	1.099	163	假阳性 false
<i>Sfn3</i>	B78	0.198 *	0.356 *	127	阳性 positive
A Y966483	F68	0.645	0.781	296	阳性 positive
A Y966482	F20	0.244	0.376	223	阳性 positive
A Y966469	A7	0.911	1.186	432	阳性 positive
A Y966478	C41	1.77	1.952	229	阳性 positive
A Y966476	C27	0.479 *	0.566 *	186	阳性 positive
A Y966464	F18	0.948 *	0.959 *	201	阳性 positive
A Y966462	H59	0.549	0.51	201	假阳性 false

注: \* 为 3 次重复的平均值

Notes: \* represents triple repeats

### 2.4 已知同源基因的初步分析

剔除已知的假阳性克隆 B22 和 H59 后,在所分析的 22 个基因中,有 14 个基因在鱼类中有同源基因,其中 4 个基因与 GenBank 现有的牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)基因同源。另外,值得注意的是克隆 A11 和 A15 与蛙类(*Xenopus tropicalis*)基因同源,因为牙鲆眼睛移动同样受甲状腺激素控制,这和甲状腺控制蛙类尾巴退化一样。在 22 个基因中,13 个只有已知 cDNA,而另外 9 个为已知蛋白的同源基因,分别为 prolactin receptor-like, *COL1A1*, M3-muscarinic receptor, *Sfn3*, tropomyosin, ribosomal protein L27, *GA PDH*, *COL1A3*, ribosomal protein S12(表 2)。现对其进行简单的介绍:

(1) 催乳激素受体类蛋白(prolactin receptor-like):催乳激素已经证明能抑制牙鲆的眼睛移动<sup>[13]</sup>。

(2) M3-muscarinic receptor:具有防止细胞凋亡的能力<sup>[14]</sup>。

(3) tropomyosin:在细胞迁移中,它是 F 型肌动蛋白功能特异性的主要调节因子<sup>[15]</sup>。

(4) splicing factor arginine/serine-rich 3(*Sfn3*):

RNA 可变剪接辅助因子,同时参与细胞分裂周期的控制<sup>[16]</sup>。

(5) 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GA PDH*):主要参与糖酵解途径。近年来发现还有其他的作用,如能与 RNA 特异性结合,降解 RNA<sup>[17]</sup>。

(6) I 型胶原蛋白 1 亚基(collagen type I alpha 1, *COL1A1*):I 型胶原蛋白的主要组成成份<sup>[18]</sup>。I 型胶原蛋白是细胞外基质的主要组成部分,不仅对于维持细胞的形态和结构起重要作用,而且对于细胞的生长、分化、代谢、信号传导等功能有重要影响<sup>[19]</sup>。

(7) I 型胶原蛋白 3 亚基(collagen type I alpha 3, *COL1A3*):鱼类特有的 I 型胶原蛋白的组成成份<sup>[18]</sup>。

(8) 核糖体大亚基蛋白 L27(ribosomal protein L27):核糖体大亚基蛋白之一,对于核糖体的组装和功能起着主要作用<sup>[20]</sup>。但近年研究表明 L27 也可能参与自体免疫过程<sup>[21]</sup>。

(9) 核糖体小亚基蛋白 S12(ribosomal protein S12):核糖体小亚基蛋白之一,和 S13 一起维持 RNA 转译蛋白质过程的预转译状态的稳定性<sup>[22]</sup>。

### 3 讨论

经过牙鲈变态前的基因差减,本文报道了变态早期差减文库的建立和筛选的结果。本研究中差减库的平均大小基本上在 600 bp 左右,符合 *Rsa* I 内切酶的分布频率,说明是比较成功的。如果差减库的平均大小只有 200~300 bp,说明 RNA 有所降解,从而导致某些差异表达的基因得不到克隆。差减文库建立的另一个关键是 PCR 产物的转化。由于使用没有经过纯化的 PCR 产物直接连接 T 载体,转化的效率比较低,因此,制备高质量的感受态细菌十分关键。

差减库的筛选一般采用反向差减库的菌落杂交筛选,比较麻烦,然后再需要经过 Northern blot 验证。由于 Northern blot 操作烦琐,不可能对每个克隆进行验证。由于建立差减文库的目的是筛选差异表达的基因,所以完全可以利用半定量 RT-PCR 或定量 PCR 进行表达量检测,并且 RT-PCR 的要比 Northern blot 更敏感。本研究利用 18S rRNA 作内标,其稳定性要比  $\beta$ -actin, GAPDH 稳定<sup>[23-25]</sup>,这对正确比较基因表达量的差异是非常重要的,尤其是对于在渐进的发育过程中,基因表达量差异比较小的情况下。利用半定量 RT-PCR 筛选分析,本差减文库的阳性率为 81.8%,和已经报道的文献相比,也是在可以接受的范围内,采用抑制差减法克隆差异表达基因的阳性率一般在 50%以上<sup>[7]</sup>。

本研究中利用半定量 RT-PCR 抽样检测,发现被检测的的基因都是体现为表达量的差异,没有特异基因的表达,这和文献[10]的报道相似,在太谷核不育小麦花药败育过程中筛选的阳性克隆,也全部体现为表达量的差异。同时也提示我们,与眼睛移动相关的基因可能在眼睛移动之前就已表达,控制眼睛移动基因通过表达水平的变化来完成此过程。

在本差减库中已经初步确定为阳性的 22 个基因中,所有基因都有同源序列,但是多数为未知蛋白的基因。提示我们,在参与牙鲈头部眼睛移动过程中,有可能不存在牙鲈特有的基因。在已知蛋白的同源基因中,非常值得注意 *COL1A1* 基因,其在差减库中有高达 22.2% 的分布频率,虽然其作为结构蛋白,可能有比较高的表达量,但是,如果本实验中的差减效率不够,那我们应该会

筛选到表达量更高的 18S rRNA, 28S rRNA 等核糖体蛋白基因,而在本差减库中,虽然也存在核糖体小亚基蛋白 S12 和大亚基蛋白 L27,但其分布频率也分别只有 4.4% 和 2.1%,而且,与 *COL1A1* 一同组成 I 型胶原蛋白的 *COL1A3* 的出现频率也只有 2.1%,所以,大量的 *COL1A1* 基因在差减文库中出现是非常奇怪的,有待今后进一步地研究。另外,催乳激素受体类蛋白也值得进一步地研究,因为催乳激素能抑制牙鲈眼睛移动,催乳激素受体类蛋白是否通过抑制催乳激素受体与催乳激素结合,从而起到促进眼睛移动?此外,我们已经对 *Sfrs3* 基因进行了整体原位检测,发现 *Sfrs3* 基因参与变态高峰期牙鲈眼睛移动的组织学的变化<sup>[26]</sup>。

总之,我们通过建立牙鲈变态早期头部差异表达的 cDNA 文库,筛选了部分基因,并对部分基因进行了初步的分析。虽然,我们只是对其中的克隆进行分析,但由于是随机选择的,应该能代表整个差减文库的情况。本研究的结果,对于今后进一步开展鲈形目鱼类眼睛移动机制的研究应该有一定的帮助。

衷心感谢复旦大学遗传工程国家重点实验室陈丽珊博士、吕韵哲博士、姚纪花博士对本项研究的有关帮助。

### 参考文献:

- [ 1 ] Inui Y, Miwa S. Thyroid hormone induces metamorphosis of flounder larvae[J]. Gen Comp Endocrinol, 1985, 60: 450 - 454.
- [ 2 ] Schreiber A M, Specker J L. Metamorphosis in the summer flounder *Paralichthys dentatus*: stage-specific developmental response to altered thyroid status [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 111: 156 - 166.
- [ 3 ] Yamano K, Araki K, Sekikawa K, et al. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder [J]. Dev Genet, 1994, 15: 378 - 382.
- [ 4 ] Yamano K, Miwa S. Differential gene expression of thyroid hormone receptor and in fish development [J]. Gen Comp Endocrinol, 1998, 109: 75 - 85.
- [ 5 ] Hashimoto H, Mizuta A, Okada N, et al. Isolation and characterization of a Japanese flounder clonal line, reversed, which exhibits reversal of metamorphic left-right asymmetry [J]. Mechanisms Dev, 2002, 111: 17 - 24.
- [ 6 ] Diatchenko L, Lau C, 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.
- [ 7 ] Winstanley C. Spot the difference: applications of subtractive hybridization to the study of bacterial pathogens [J]. J Med Microbiol, 2002, 51:459 - 467.
- [ 8 ] von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25:2598 - 2602.
- [ 9 ] Fällschr C, Zapletal C, Kremer M, et al. Identification of differentially expressed genes after partial rat liver ischemia/reperfusion by suppression subtractive hybridization [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11:1303 - 1316.
- [10] 常青山, 周荣华, 余增亮, 等. 用差减抑制杂交方法鉴定太谷核不育小麦花药败育过程中的特异表达基因[J]. 高技术通讯, 2003, 13:30 - 33.
- [11] Miwa S, Inui Y. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Cell Tissue Res, 1987, 249:117 - 123.
- [12] Miwa S, Tagawa M, Inui Y. Thyroxine surge in metamorphosing flounder larvae [J]. Gen Comp Endocrinol, 1988, 70:158 - 163.
- [13] de Jesus E G, Hirano T, Inui Y. The antimetamorphic effect of prolactin in the Japanese flounder [J]. Gen Comp Endocrinol, 1994, 93:44 - 50.
- [14] Budd D C, McDonald J, Emsley N, et al. The C-terminal tail of the M3-muscarinic receptor possesses anti-apoptotic properties [J]. Hear Res, 2002, 174:86 - 92.
- [15] Gupton S L, Anderson K L, Kole T P, et al. Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin [J]. J Cell Biol, 2005, 168:619 - 631.
- [16] Jumaa H, Guenet J L, Nielsen P J. Regulated expression and RNA processing of transcripts from the Srp20 splicing factor gene during the cell cycle [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17:3116 - 3124.
- [17] Evguenieva-Hackenberg E, Schiltz E, Klug G. Dehydrogenases from all three domains of life cleave RNA [J]. J Biol Chem, 2002, 277:46145 - 46150.
- [18] Saito M, Takenouchi Y, Kunisaki N, et al. Complete primary structure of rainbow trout type I collagen consisting of *alpha1(I)* *alpha2(I)* *alpha3(I)* heterotrimers [J]. Eur J Biochem, 2001, 268:2817 - 2827.
- [19] Bissell D M. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report [J]. J Gastroenterol, 1998, 33:295 - 302.
- [20] Wower I K, Wower J, Zimmermann R A. Ribosomal protein L27 participates in both 50 S subunit assembly and the peptidyl transferase reaction [J]. J Biol Chem, 1998, 273:19847 - 19852.
- [21] Perone D, Santos M A, Peixoto M S, et al. Trypanosoma cruzi: identification and characterization of a novel ribosomal protein L27 (TerL27) that cross-reacts with an affinity-purified anti-Sm antibody [J]. Parasitology, 2003, 126:577 - 583.
- [22] Cukras A R, Southworth D R, Brunelle J L, et al. Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex [J]. Mol Cell, 2003, 12:321 - 328.
- [23] Thu K M, Ji Z, Amutha B, et al. Differential expression of glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase (GAPDH), actin and hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) in postnatal rabbit sclera [J]. Current Eye Research, 2001, 23:44 - 50.
- [24] Pola R, Ling L E, Silver M, et al. The morphogen sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors [J]. Nat Med, 2001, 7:706 - 711.
- [25] 杨桂梅, 鲍宝龙, 龚小玲, 等. GAPDH、-actin 和 18S rRNA 作为相对定量的内标在牙鲆发育阶段的稳定性比较[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(1):72 - 76.
- [26] Bao B, Yang G, Liu Z, et al. Isolation of SFRS3 gene and its differential expression during metamorphosis involving eye migration of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, 1725:64 - 70.