

抑制消减杂交技术在鲤鱼抗寒研究中的应用

梁利群^{1,2}, 李绍戊^{2,3}, 常玉梅², 高俊生^{2,4}, 孙效文², 雷清泉¹

(1. 哈尔滨理工大学, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 3. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090; 4. 大连水产学院 生命科学与技术学院, 辽宁 大连 116023)

摘要:用抑制性消减杂交技术(SSH)研究与鲤鱼(*Cyprinus carpio*)抗寒性状相关的基因。通过对荷包红鲤抗寒品系(*Cyprinus carpio wuyanensis* Tchang)和柏氏鲤(*Cyprinus pellegrini* Tchang)杂交F₂代进行降温诱导实验,获得不同温度下的实验材料。利用抑制性消减杂交技术构建了一个低温下差异表达基因的消减cDNA文库,共含有2000个克隆。对其中480个克隆进行斑点杂交筛选,共得到60个阳性克隆,选取其中29个克隆测序。通过序列分析比对,13个克隆与已知基因序列高度同源,同源率为85%~98%;另外的13个克隆为未知新基因序列。在13个同源性较高的克隆序列中,有brevican基因、AMP-acid连接酶、CFL2基因、催产素基因、主要组织相容复合体(MHC)Ⅱβ链、锌指蛋白、细胞色素氧化酶、EPD-1基因、透明质酸结合蛋白多糖类、核受体/类视色素信号调节器等,其中9个基因上调表达,另有4个则抑制表达。这些基因的获得可为研究鱼类抗寒性状以及从分子水平上阐明其机制提供重要依据。[中国水产科学,2006,13(2):193-199]

关键词:抗寒机制;抑制性消减杂交;消减cDNA文库;鲤鱼

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2006)02-0193-07

有关鱼类耐寒与不耐寒机理至今尚不清楚,已报道的鱼类耐寒机理研究多是从生理、生化角度进行探索,如细胞膜的流动性、钙离子泵的差异^[1-4]、脂类代谢的差别、同工酶的差异等^[1]。但是,有关鱼类抗寒机制的分子遗传基础尚不明。近年来鱼类抗寒机制方面的研究也从早期的生理生化水平转到分子水平,Wu等^[5]用极地鱼类的抗冻蛋白基因(AFP)构建转基因罗非鱼(*Oreochromis mossambicus* Peters),试图构建耐低温的罗非鱼新品种,但实验结果不理想。梁利群等^{[6]2)}初步建立了适于抗寒分析的实验鱼体系,获得了6个与抗寒性状相关的分子标记,确定了抗寒性状是多基因控制的数量性状,并将5N1451c这一与鲤鱼抗寒性状相关的分子标记定位到鲤鱼(*Cyprinus carpio*)的遗传连锁图谱上。另外,很多研究表明,冷驯化下鱼类基因的表达多表现为上调,这些基因主要包括细胞色素c氧化酶^[7]、细胞色素P450^[8]、抗冻蛋白基因^[9]、肉毒碱软

脂转移酶I^[10]、Wap65^[11]等。Ju等^[12]利用微阵列技术对斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)进行低温诱导,并对其脑组织不同温度下基因差异表达情况进行了分析,从660个分析的基因中获得61个差异表达的基因,其中包括分子伴侣基因,如Hsp70蛋白、转录因子及信号传导途径基因产物、脂类代谢基因如TB2和乙酰辅酶A结合蛋白、核糖体蛋白基因等。但是,限于目前的技术水平,有关温度变化下基因表达情况的系统分析仍未建立。

1996年,Diatchenko等^[13]建立了一种新的cDNA消减杂交方法称为抑制性消减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH),用于分离两个mRNA群体间差异表达的基因。它克服了DDRT-PCR法的假阳性较高和RDA法消减杂交轮次较多的缺点^[14-16],非常适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能研究,成为差异表达基因筛选的最有潜力的新方法。本实验利用SSH法对鲤抗

收稿日期:2005-07-14; 修订日期:2005-10-24.

基金项目:国家“973”基础研究项目资助(2004CB317404).

作者简介:梁利群(1963-),女,硕士生导师,研究员,从事水产动物基因组研究。Tel:0451-8486314; E-mail:llq-1019@163.com

1)杜运明. 几种养殖鱼类越冬生理生化指标的变化Ⅱ、V——脑AChE、LH1同工酶、EST同工酶、脂肪酸组成、北方越冬鱼类死亡原因及提高成活率的研究. 1995,83-92,109-124.

2)梁利群,孙效文. 鲤鱼抗寒性状分子标记在遗传连锁图谱上的定位[C]. 水产学会年会论文集. 2000.

寒实验鱼体系中的 F_2 代之间在不同温度下的基因差异表达情况进行研究,旨在分离获得与鲤鱼抗寒相关的基因,为进一步从分子水平上揭示鱼类抗寒作用机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

以荷包红鲤抗寒品系 (*Cyprinus carpio wuyangensis*)^[17] (♂) 和柏氏鲤 (*Cyprinus pellegrini* Tchang) (♀) 杂交 F_2 为研究对象,通过降温实验,将大小均一、健康的 F_2 从水温为 16 ℃ (常温) 水中分别放入 10 ℃ 和 4 ℃ 的水族箱中,并使实验鱼在其中维持生存 5 d。采取温度骤降及不同维持时间实验鱼的脑组织,每个点 5 尾,冻存于液氮中备用。本实验中选取两个骤降点 10 ℃ 和 4 ℃ 的脑组织作为消减对象。

1.2 试剂

Trizol 购自 Invitrogen 公司, Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit, PCR-Select cDNA Subtraction Kit, Advantage cDNA PCR Kit 均购自 Clontech 公司, pMD 18-T vector 购自 TaKaRa 公司, NC 膜购自 Amersham Biosciences, *E. coli* DH5 α 为本实验室保存菌种。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 总 RNA 提取以及全长 cDNA 的合成

按照 Trizol 试剂说明书对 10 ℃ 及 4 ℃ 脑组织提取总 RNA,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计对提取的 RNA 进行定性定量检测。cDNA 的合成按照 Super SMART PCR cDNA Synthesis Kit,从总 RNA 直接反转录合成。

1.4 消减 cDNA 文库的构建

分别以 10 ℃ 和 4 ℃ 脑组织 cDNA 互为 tester 和 driver,采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit 试剂盒进行正向(以 4 ℃ 为 tester, 10 ℃ 为 driver)及反向(以 10 ℃ 为 tester, 4 ℃ 为 driver)消减杂交。将正向杂交的 PCR 产物克隆至 pMD 18-T vector 中,建立富含低温鲤鱼脑组织中特异表达基因的正向消减 cDNA 文库。

1.5 斑点杂交筛选消减 cDNA 文库

1.5.1 探针的制备 分别选取正向消减杂交(以 4 ℃ 为 tester, 10 ℃ 为 driver)和反向消减杂交(以 10 ℃ 为 tester, 4 ℃ 为 driver)的 PCR 产物 50 μ L,经酚氯仿抽提、乙醇沉淀纯化后制备探针。探针标记

采用随机引物标记法,选用放射性核素 α - 32 P dCTP 进行探针标记。

1.5.2 斑点杂交 从文库中随机挑选 480 个克隆,编号,利用测序引物 RV-M 和 M13-47 进行菌落 PCR 扩增,将扩增片段大于 300 bp 的 PCR 产物点到 NC 膜上(同时制备两张重复膜),进行斑点杂交。取约 100 ng 正向及反向消减 cDNA 群体标记探针,分别用来杂交同一 cDNA 文库的重复两套拷贝膜。杂交、洗膜的具体步骤参照《分子克隆实验指南》(第 3 版)^[18]。

1.6 测序及序列分析

将筛选出的仅与正向消减 cDNA 探针杂交的克隆,以及与正向消减 cDNA 探针杂交信号明显强于反向消减 cDNA 探针的克隆菌株送至北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。利用 BLAST 软件搜索 GenBank 中同源序列进行比较。

2 结果

2.1 研究对象的选择

本实验中选取两个温度骤降点 10 ℃ 和 4 ℃ 下各 5 尾鱼的脑组织混合样作为研究对象,旨在寻找骤降至低温时鱼类脑组织中基因的差异表达情况,进而筛选到与温度相关的基因。许多研究表明,低温首先会影响鱼类的中枢神经系统。另外,鲤鱼在常温下(10~16 ℃)能够正常存活,而在温度骤降至 4 ℃ 时则出现明显的行动缓慢、异常,甚至死亡。通过 SSH 对两个骤降点下基因差异表达进行比较筛选,寄希望发现与鲤鱼抗寒相关的基因,进而研究其机理。

2.2 组织总 RNA 的提取

利用 Trizol 试剂提取脑组织的总 RNA,1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测表明,28S 和 18S 条带清晰,且 28S 与 18S 的浓度比在 2:1~2.5:1;分光光度计检测 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.8 以上,表明已获得质量和纯度较好的总 RNA(图 1)。

2.3 连接效率的检测

消减杂交前接头的连接效率直接会影响后面消减杂交的效果,从而最终影响文库的成功率。本实验中根据鲤鱼 α -tubulin 看家基因序列设计引物,以检测连接效率(图 2)。具体反应参数:75 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min(40 cycles); 72 ℃ 10 min。从图 2 中可以看出,泳道 1、3 以 α -tubulin 下游引物和 PCR primer 1 进行扩增,泳道 2、4 以 α -

tubulin 上下游引物进行扩增,泳道 2、4 的片段明显要小于泳道 1、3,但是亮度比高于 4:1,表明连接效率较高。

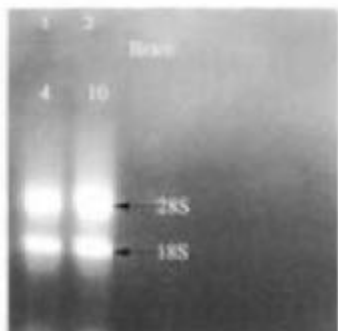


图1 不同骤降点下鲤鱼脑组织的总 RNA
1:4 °C 时脑组织总 RNA; 2:10 °C 时脑组织总 RNA

Fig.1 Total RNAs isolated from brain of common carp under different temperatures

Lane 1: total RNA isolated from brain at 4 °C;
Lane 2: total RNA isolated from brain at 10 °C

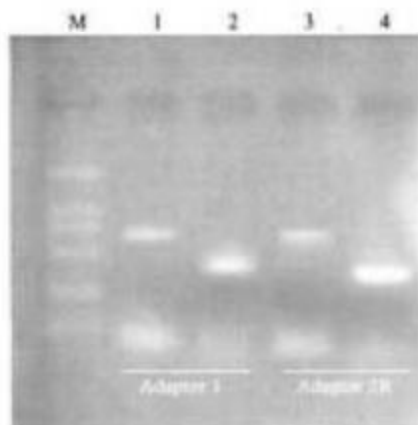


图2 PCR 检测两种接头的连接效率

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1, 3: 以 P2 和 PCR primer 1 为引物; 2, 4: 以 P1 和 P2 为引物

Fig.2 Results of the adaptor ligation efficiency by PCR
M: DNA marker DL2000; 1, 3: PCR products are generated by PCR primer 1 and downstream primer P2 of α -tubulin; 2, 4: PCR products are generated by primers P1 and P2

2.4 消减效率的检测

为了检测抗寒相关基因消减 cDNA 文库的消减效率,以鲤鱼看家基因 α -tubulin 做检测指标,通过比较它们在经过消减和未经消减的 cDNA 中丰度的相差倍数。以未经消减的 cDNA 为模板, α -tubulin

基因在 18 个循环处即出现条带,而以消减后的 cDNA 为模板, α -tubulin 基因则在 28 个循环处才出现较强的条带,因此对于 α -tubulin 基因来讲,消减杂交将其减弱了 $2^8 \sim 2^{10}$ 倍(图 3)。

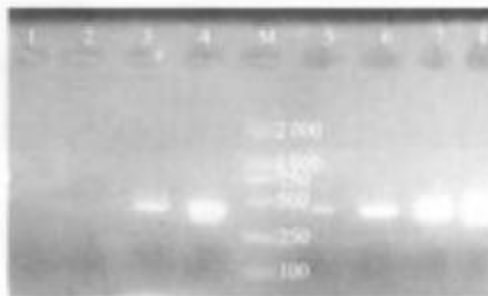


图3 以 α -tubulin 基因为指标,通过 PCR 检测消减杂交效率

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1-4: 以消减后的 cDNA 为模板; 5-8: 以未经消减的 cDNA 为模板; 1 和 5: 18 个循环; 2 和 6: 23 个循环; 3 和 7: 28 个循环; 4 和 8: 33 个循环

Fig.3 PCR analysis of the subtracted hybridized efficiency by α -tubulin

PCR was performed on subtracted cDNA (lanes 1-4) and un-subtracted cDNA (lanes 5-8). M: DNA Marker DL2000; lanes 1 and 5: 18 cycles; lanes 2 and 6: 23 cycles; lanes 3 and 7: 28 cycles; lanes 4 and 8: 33 cycles

2.5 消减 cDNA 文库的构建

利用 SSH 技术,以 4 °C 时脑组织为 tester, 10 °C 时的脑组织为 driver,建立了含有 2 000 个克隆的正向消减 cDNA 文库。将消减后的 cDNA 连接到 pMD 18-T vector 中,并转入大肠杆菌 DH 5 α 。随即挑取 16 个单菌落,分别以测序引物(RV-M 和 M13-47)和巢式引物(nested PCR primer 1 和 nested PCR primer 2)进行菌落 PCR,以检测文库中片段插入情况(图 4 和图 5)。从图 4 和图 5 中可以看出,片段大小主要集中在 300~1 000 bp,表明文库中片段插入率接近 100%。

2.6 斑点杂交

从斑点杂交结果看,仅与正向消减 cDNA 探针杂交的克隆,以及与正向消减 cDNA 探针杂交信号明显强于反向消减 cDNA 探针的克隆,共计 60 个,占筛选总数的 12.5%,即消减 cDNA 文库中 12.5% 的克隆代表了 4 °C 脑组织中特异表达或表达增强的基因。与两个探针杂交信号强弱相近的克隆可视为背景,而与两者均无杂交信号的克隆可能代表了极低丰度的 cDNA,或是假阳性重组子(图 6)。



图4 以测序引物进行菌落 PCR 检测
M: DNA 分子量标准 DL2000; 1-9 为随机选取的 9 个克隆

Fig.4 PCR analysis of the positive clone by primers RV-M and M13-47

M: DNA marker DL2000; lanes 1-9: 9 randomly picked clones



图5 以巢式引物进行 PCR 检测
M: DNA 分子量标准 DL2000; 1-6 为随机选取的 6 个克隆
Fig.5 PCR analysis of the positive clone nested primers

M: DNA marker DL2000; lanes 1-6: 6 randomly picked clones

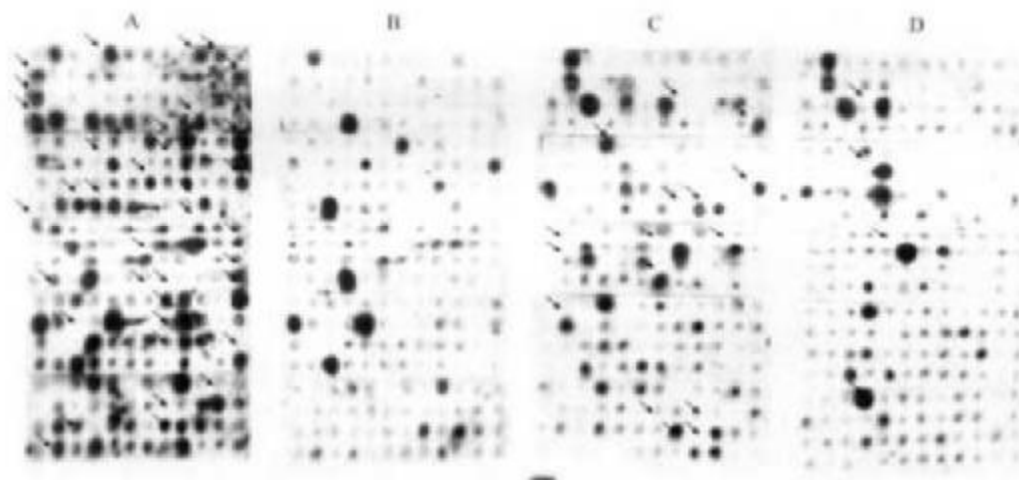


图6 斑点杂交检测阳性克隆
A、C 列: 以正向消减 cDNA 为探针; B、D 列: 以反向消减 cDNA 为探针
Fig.6 Dot blotting analysis of the positive clones

A, C: Probe was prepared by forward SSH PCR II products; B, D: Probe was prepared by reverse SSH PCR II products

2.7 序列分析

从挑取 29 个克隆测序, 除 3 个克隆测序失败外, 其余的 26 个序列通过 BLAST 进行比对。序列分析及同源序列的查询结果如表 1 所示。表 1 所列为 13 个比对后源性较高的克隆, 另有 13 个序列为未知新基因序列。

3 讨论

目前进行的抗寒方面的研究多是在植物领域, 且研究多集中于将抗冻蛋白基因转入植物如番茄、马铃薯、玉米等中, 以达到提高其抗寒力的目的。此类研究已取得了显著的效果。但是由于 AFP 基因

往往并不能被正确修饰, 甚至在有的实验中, 转基因植物已经表达了较高水平的 AFP 基因, 但仍无抗冻活性。因此, 迫切需要找到真正与抗寒相关的基因。鱼类作为一种变温动物, 能够适应较大的温度变化。在鱼类的生命进程中, 某种特定类型的细胞中只有 10%~15% 的基因表达。由于这些基因的特异性决定了从受精卵到机体死亡的整个生命过程, 所以这些基因的时空表达是受到严格调控的。在不同发育阶段, 不同生理状态和不同类型的细胞中, 表达的基因各不相同。因此, 比较两种不同温度下细胞中基因表达的差异, 可以探究鱼类抗寒性状的遗传机理。

表1 DNA序列分析和同源性比较结果
Tab.1 DNA sequence analysis and results of identities

克隆编号 Clone number	片段大小/bp Insert size	同源性比较 Homolog (protein)	物种 Species	E	GenBank 编号 GenBank Accession No.
col-t 2	646	brevican 基因	斑马鱼	4e-17	AB127939
col-t 9	294	CFL 2 基因	斑马鱼	9e-44	AY398324
col-t 10	563	中催产素基因	鲤鱼	4e-75	AF322651
col-t 11	1107	假定蛋白	疟疾原虫	4.1	CA104197
col-t 15	474	酪氨酸 3-加单氧酶/色氨酸 5-加单氧酶活化蛋白基因	斑马鱼	2e-61	BC066409
col-t 21	544	凝血素基因	果蝇	9.3	BAA88518
col-t 22	294	主要组织相容复合体 II β 链	鲤鱼	2e-44	CAA64706
col-t 23	217	bactin 2 基因	斑马鱼	3e-67	BC045879
col-t 24	434	核受体/类视色素信号调节器	斑马鱼	1e-105	S80986
col-t 27	430	EPD-1 基因	金鱼	1e-176	X14134
		脑糖蛋白前体	鲫鱼	8e-58	CAA32352
col-t 28	391	锌指蛋白 zic 1	斑马鱼	0.0	AF127981
col-t 29	362	线粒体基因组中 COI 基因	鲤鱼	0.0	X61010
col-t 30	525	zgc66343	斑马鱼	2e-144	BC055608

本实验利用抑制消减杂交技术(SSH)对不同温度下鲤鱼脑组织中基因差异表达情况进行了分析研究。研究表明,所建立的消减文库中约 12.5% 的基因为低温下鲤鱼脑组织特异表达基因,其中大多为未知基因(13 个)。在已知基因中,编号为 col-t 2、col-t 9、col-t 10、col-t 11、col-t 15、col-t 21、col-t 22、col-t 23、col-t 24 的基因表现为上调,而编号为 col-t 27、col-t 28、col-t 29、col-t 30 的基因则抑制表达。鉴于众多的未知基因,有关抗寒的分子遗传机理还不能很好地阐述。Ju 等^[12]提出了一个假设,即在降温过程中,发生了一系列的信号传导和转录因子的激活,从而指导新的蛋白质的合成以及分子伴侣对蛋白的修饰,最终适应温度的转变。这些基因的表达多为瞬时和快速的,当然也存在一些持续表达基因。

在 9 个上调表达的基因中,brevican 基因作为信号传递者,有抑制组织再生的功能。随着温度的降低,brevican 表达量增加,可能与抑制组织生长有关,从而导致鱼体免疫力下降和死亡。Cofilin 2 (CFL 2)基因编码 cofilin 蛋白,是一种小分子肌动蛋白结合蛋白。Cofilin 的磷酸化过程与增加细胞运动的一种激酶(PAK)正相关,鱼体降温时 cofilin 的表达量增加表明,鱼体可能需要增加细胞的运动以便最终适应温度的转变。AMP-acid 连接酶多用于

脂类转运、代谢过程,它有可能参与了降温过程中细胞膜的脂类代谢,并改变了膜脂的组成,以维持膜的流动性和功能。Bly 等^[20]曾指出,在降温时,鱼体内的不饱和脂肪酸增加。MHC 即主要组织相容性复合体,存在于抗原提示细胞上,与某些疾病的易感性有关,控制机体对抗原的免疫应答或免疫抑制。温度降低后,MHC 的表达量增加,增加了机体的免疫能力,有利于鱼类在低温下存活。另有如催产素基因、bactin 2 基因等,无法确知其具体的作用机理。

锌指蛋白基因和细胞色素氧化酶均为下调表达。锌指蛋白多与基因表达调控有关,它的缺失可以引起一些疾病,而低温环境可能阻止了该基因的转录途径,其具体的作用机制尚有待研究。细胞色素氧化酶是呼吸链的组成部分,低温导致该基因的下调表达,引起鱼类呼吸功能的改变,对于研究鱼类的抗寒机制有重要的作用。

另外,由于时间原因,未能将所建的消减文库进行全部检测以及进行后续工作。通过该研究,期望可以对鱼类抗寒作用机制的探索提供一个依据,所发现的差异表达基因有可能对以后的抗寒方面的研究工作提供重要的参考价值。

致谢:本研究得到哈尔滨工业大学张起涛同学的大力支持,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Lyons J M, Granham D, Raison J K. Low temperature stress in carp plants: The role of the membrane[M]. New York: Academic Press, 1970. 33-56.
- [2] 邓会山, 林运明. 鱼血红细胞膜流动性的研究[J]. 大连水产学院学报, 1993, 8(1): 9-13.
- [3] Brown W D. Glucose metabolism in carp[J]. Cellular Comp Physiol, 1960, 55: 81-85.
- [4] 冯祖强, 王祖照. 鲢鱼冷休克及其死亡的某些生化因素[J]. 水生生物学集刊, 1984, 8(3): 290-297.
- [5] Su-Mei Wu, Pung-pung Hwang, Choy-Leong Hew, et al. Effect of antifreeze protein on cold tolerance in juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and milkfish (*Chanos chanos* Forskal)[J]. Zoological Studies, 1998, 37(1): 39-44.
- [6] 梁利群, 孙效文. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析[J]. 中国水产科学, 1997, 4(3): 89-91.
- [7] Hardewig I, Van Dijk PLM, Moyes C D, et al. Temperature-dependent expression of cytochrome-c oxidase in Antarctic and temperate fish[J]. Am J Physiol, 1999, 277: R508-R516.
- [8] Klopper-Sara P J, Stegeman J J. Effects of temperature acclimation on the expression of hepatic cytochrome P4501A mRNA and protein in the fish *Fundulus heteroclitus*[J]. Arch Biochem Biophys, 1992, 299: 38-46.
- [9] Pickett M H, Hew C L, Davis P L. Seasonal variation in the level of antifreeze protein mRNA from the winter flounder[J]. Biochim Biophys Acta, 1983, 739: 97-104.
- [10] Rodnick K J, Sidell B D. Cold acclimation increases carnitine palmitoyltransferase I activity in oxidative muscle of striped bass[J]. Am J Physiol, 1994, 266: R405-R412.
- [11] Kikuchi K, Yamashita M, Watabe S, et al. The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression[J]. J Biol Chem, 1995, 270: 17 087-17 092.
- [12] Ju Z, Dunham RA, Liu Z. Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation[J]. Mol Genet Genomics, 2002, 268: 87-95.
- [13] Diatchenko L, Chris 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: 6 025-6 030.
- [14] Von Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high through put screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(13): 2 598-2 602.
- [15] Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, et al. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line[J]. Nucleic Acids Research, 1998, 26(4): 1 116-1 123.
- [16] Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate[J]. Analytical Biochemistry, 1996, 240: 90-97.
- [17] 沈俊宝, 刘明华. 荷包红鲤抗寒品系的筛选和培育[J]. 淡水渔业, 1988(3): 14-17.
- [18] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 8.
- [19] Bly J E, Clem L W. Temperature-mediated processes in teleost immunity: *in vitro* immunosuppression induced by *in vivo* low temperature in channel catfish[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1991, 28: 365-377.
- [20] Bly J E, Buttske T M, Meydrech E F, et al. The effects of *in vivo* acclimation temperature on the fatty acid composition of channel catfish peripheral blood cells[J]. Comp Biochem Physiol B, 1986, 83: 791-795.

Application of suppression subtractive hybridization (SSH) to study of cold tolerance in common carp (*Cyprinus carpio*)

LIANG Li-qun^{1,2}, LI Shao-wu^{2,3}, CHANG Yu-mei², GAO Jun-sheng^{2,4}, SUN Xiao-wen², LEI Qing-quan¹

(1. Harbin University of Science and Technology, Harbin 150080, China; 2. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China; 3. College of Life Sciences and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China; 4. College of Life Sciences and Technology, Dalian Fisheries College, Dalian 116023, China)

Abstract: Suppression subtractive hybridization (SSH) is a powerful means to identify the differentially expressed genes including low, rare abundance transcripts. In this study, SSH was used to identify the cold tolerance-related genes in the brain of common carp (*Cyprinus carpio*). The materials were prepared by cooling the cross F₂ of purple red carp (*Cyprinus carpio wuyuanensis* Tchang) cold-tolerant strains and Boshi carp (*Cyprinus pellegrini* Tchang) to different temperatures. After isolation of total RNA, double strand cDNAs were synthesized and digested with restriction enzyme *Rsa* I. The digested tester was then ligated to two different adaptors. Following the subtractive hybridization between the tester and the driver, a subtracted cDNA library, where enriched genes were expressed differentially under the lower temperature, was then constructed containing 2 000 clones. Among 480 clones detected by dot blotting, 60 positive clones were determined to differentially express, and 29 clones were sequenced and aligned on Internet, which showed higher identities among 13 clones. The major differentially expressed genes included brevicin genes, AMP-acid ligase, muscle cofilin 2 (CFL 2) gene, isotocin gene, MHC class II β chain, zinc finger protein, cytochrome oxydase, EPD-1 gene, sup-related nuclear receptor/retinoid signaling modulator and so on. Nine genes were induced up regulated, indicating the variation of regulating genes to adapt the lower temperature. Four genes were down regulated, indicating the reduced metabolic activities during the cooling process. This study plays an important role in researching the molecular genetic mechanism of fish cold tolerance at the molecular level. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(2): 193 - 199]

Key words: cold tolerance mechanism; suppression subtractive hybridization (SSH); subtracted cDNA library; *Cyprinus carpio*