

抑制性消减杂交技术在养殖鱼类免疫基因克隆中的应用

王传娟, 张晓华, 贾爱荣

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:抑制性消减杂交技术(SSH)是近年来兴起的一种分离、克隆差异基因的新技术,它结合了消减杂交和抑制 PCR 的优点,具有操作简便、特异性强、背景低及重复性好的优点。目前已经用 SSH 技术鉴定出了鱼的许多免疫相关基因,如白细胞介素、趋化因子、肿瘤坏死因子、溶菌酶、NKEF、补体、干扰素及急性期蛋白基因等,对它们的结构和功能进行了较为深入的研究。本文对 SSH 技术在养殖鱼类中克隆的免疫基因进行了归纳与总结,旨在全面了解鱼类的抗病免疫基因提供基础资料。[中国水产科学,2007,14(3):504-512]

关键词:抑制性消减杂交技术;SSH;水产养殖鱼类;基因克隆;免疫基因

中图分类号:S91 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8377-(2007)03-0504-09

长期以来,对水产养殖鱼类疾病的防治主要是使用疫苗。近年来,第4代核酸疫苗虽开辟了疫苗学的一个崭新领域,但是由于免疫效果不稳定,免疫机制、安全性问题在理论上还没有解决,因此限制了核酸疫苗的推广应用。抗病育种是鱼类疾病预防的最有效策略,利用抗病基因进行抗病育种是一种有效的途径,因此首先应对抗病免疫基因进行全面的了解^[1-2]。然而,目前在鱼类尚未得到有效的抗病基因,而且对鱼类感染病原后的免疫机制也缺乏深入认识^[3],原因是鱼类免疫基因与哺乳类相比有较大程度的变异。如果借鉴已有的哺乳类免疫基因信息,仅用传统的 PCR 和杂交方法来鉴定鱼类同源免疫基因比较困难^[4-5]。抑制性差减杂交(Suppressive subtractive hybridization, SSH)技术是最近发展起来的分离差异表达基因的有效方法,能指数富集稀有差异表达基因。与原来的差异显示技术(包括 DD RT-PCR、RDA、microarray、SAGE、SH,等)相比,SSH 具有简便易行、特异性高、背景低、重复性好、能分离出丰度较低的特异性片段等特点,是目前筛选差异表达基因的较好方法,近年来已得到广泛的应用。

Diatchenko 等^[6]1996 年首次以 mRNA 差别显示技术为基础建立起一项筛选未知差异表达基因的新技术,即 SSH 技术。它主要是基于抑制 PCR,并结合标准化(Normalization)和消减杂交(Subtrac-

tive hybridization, SH)技术。所谓抑制 PCR,是通过利用含引物序列的双链接头(Adaptor)充当引物模板,使两端接上同一接头的非目的双链片段具有反向末端重复序列,在退火时产生“锅一柄”结构,无法与引物配对,从而选择性抑制非目标序列的扩增,从而达到抑制非目的片段而选择性扩增目的片段的目的。该方法的标准化步骤平衡了目的基因群中 cDNA 的丰度,使原来在丰度上有差别的单链 DNA 相对含量达到基本一致,即低丰度差异表达的基因不会丢失,而高丰度差异表达的基因又不会被过量分离。消减杂交则扣除了检测子(Tester)与驱动子(Driver)间的同源序列,使不同的序列得到扩增。

1 SSH 技术的特点

SSH 技术作为新的基因克隆分析技术,结合了消减杂交和抑制 PCR 两项技术,具备两项技术的优点^[6-9]:(1)特异性高,假阳性率低。样品经过两次消减杂交,富集了差异基因,又利用 PCR 扩增了差异基因,提高了特异性,降低了假阳性。(2)具有高度灵敏性,对分离含量低的基因有优势。由于采用标准化设计,使含量不一的单链 DNA 分子含量趋于一致,有助于低含量的单链 DNA 分子的检出。有实验证明,经过一轮消减可对稀少转录物富集 1 000~5 000 倍^[10]。所需 mRNA 为 50 ng~1 μg,并可在 mRNA 总量较少的情况下,通过预扩增而获

收稿日期:2006-06-23; 修订日期:2006-09-25。

基金项目:教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-04-0646),教育部留学回国人员科研启动基金(2005383)。

作者简介:王传娟(1982-),女,硕士研究生,从事海水养殖动物病害研究。

通讯作者:张晓华(1965-),女,博士,教授,从事海洋微生物及海水养殖动物病害研究。E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

得足够高质量的 cDNA^[6]。(3)效率高。SSH 一次可同时分离到上百个差异基因。(4)操作相对简单,有利于掌握。该技术只需两次杂交、两轮 PCR,不需移出杂交复合体,接头设计也相对简单,不需反复更换接头,也不需移出接头。(5)筛选周期短。应用 SSH 技术,一般只要 3~4 d 即可获得差异基因。

尽管 SSH 技术具有上述种种优点,但因该项技术应用不久,也存在一些缺点,如:SSH 技术对起始材料要求较多,对材料质量要求较高,不能同时进行数个材料间或不同处理材料间的比较;材料间不能存在过多差异;对于 mRNA 的量要求较多,需达到 2 μg ,且质量要高;筛选出来的克隆尚存在一定的假阳性,需利用

Northern 或 RT-PCR 等技术进一步筛选验证。

2 利用 SSH 技术在养殖鱼类中克隆的免疫基因

自 Diachenko 等^[6]的报道后,SSH 技术被许多研究者相继采用,并与多种分子生物学技术结合使用,SSH 技术也不断地得到完善。应用 SSH 技术已鉴定并克隆了多个鱼类免疫基因(表 1),并对他们的结构和功能进行了较为深入的研究。这不仅为水产养殖鱼类的抗病药物开发奠定了基础,也为揭示鱼类抗病机制的分子机理,通过分子生物学手段提高鱼的抗病力提供了技术支持。

表 1 利用 SSH 技术从养殖鱼类中克隆的部分免疫基因

Tab. 1 Some immune-related genes cloned from aquacultural fish by using SSH technique

种类 Species	免疫蛋白 Immune protein	检测子 Tester	驱动子 Driver	参考文献 Reference
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	IL-1R ^{II} , chemokine	LPS 和 TNF 混合物注射的虹鳟头肾细胞	未被处理的虹鳟头肾细胞	[15,24]
	CC, CXCL, TNF	以 PHA 活化过的虹鳟头肾造血细胞	未被处理的虹鳟头肾造血细胞	[5]
	补体因子 C3-1, C7, Bf-2, B/C2, C1	灭活鳗弧菌注射过的虹鳟的肝脏	正常虹鳟的肝脏	[43]
	补体因子 C5aR	PMA 活化过的虹鳟头肾细胞	未被处理的虹鳟头肾细胞	[46]
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	IL-1 β 及急性期蛋白 SAA 等	藻酸钠和硬聚葡萄糖混合物注射过的鲤腹膜细胞和头肾细胞	正常鲤的头肾细胞	[17]
	溶菌酶, IL-6, IL-8, CXCR4	以藻酸钠注射过的鲤腹膜细胞	正常鲤的头肾细胞	[19,21]
皱唇鲨 <i>Triakis scyllia</i>	趋化因子 Trsc-SCYA107, MIP3 α 1, MIP3 α 2	PMA 活化过的鲨腹膜白细胞	正常的鲨腹膜白细胞	[26]
大西洋鲑 <i>Salmo salar</i>	IFN 及补体因子 CD59, C4, C3/C5, C3-1, factor H, C9 等	注射 poly IC 的鲑鱼	注射 PBS 的对照组鲑鱼	[44]
鲫 <i>Carassus auratus</i> L.	IFN 及 IFN 调控因子	紫外线灭活的草鱼出血病病毒诱导的鲫鱼囊胚培养细胞	未经病毒诱导的对照组鲫鱼囊胚培养细胞	[4,54-56]
斑马鱼 <i>Danio rerio</i>	急性期蛋白 SAA 等	杀鲑气单胞菌和金黄色葡萄球菌感染的斑马鱼	未受感染的斑马鱼	[62]

2.1 鱼类的白细胞介素(interleukins, ILs)基因

白细胞介素是鱼类一种重要的免疫因子,其基因定位于不同染色体,由白细胞分泌并承担细胞的活化、增殖和分化等功能^[11]。1984 年 Caspi 和 Avtalion 首次发现鲤的白细胞中含有 IL-2 样物质^[12]。目前在鱼类中已经发现了 IL-1、IL-2 和 IL-8

等。IL-1 因子在鱼类中已发现多年,但是直到近几年 IL-1 基因才从几种硬骨鱼类中得到克隆^[13-14]。

Sangrador-Vegas 等^[15]利用 SSH 技术,从被 LPS 和人的重组肿瘤坏死因子(TNF)混合物处理过的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)头肾细胞的差减 cDNA 文库中,筛选到一种与哺乳动物 IL-1R^{II} 基

因同源的免疫基因,这是首次在非哺乳动物中获得的 IL-1R II 基因。它的 cDNA 编码 441 个氨基酸,与首次报道的鱼的 IL-1 基因的阅读框相同。其 5'端有 1 段短的 75 bp 的 UTR(非转录区)结构,3'端有 1 个 151 bp 的 UTR,并且在 polyA 尾的上游有 1 段由 13 个氨基酸组成的 AAUAAA 序列。经比对发现,虹鳟的 IL-1R II 的氨基酸序列与人的 IL-1R II 同源率为 29%,相似率为 36%;和小鼠(*Mus musculus*)的 IL-1R II 序列同源率为 26%,相似率为 33%。与人类 IL-1R II 相比,虹鳟的 IL-1R II 也含有 5 个 N 连接的糖基化位点,并且发现了 1 段与哺乳动物类似的信号肽,由 23 个氨基酸序列组成(哺乳动物的信号肽由 13 个氨基酸组成)。Sangrador-Vegas 等^[15]的研究结果还显示,在鱼类体内也存在着与哺乳动物 IL-1AcP 类似的、在抵抗环境影响及病原菌刺激中发挥重要作用的 IL-1 因子,而且在基因进化上还要早于哺乳动物。Liu 等^[16]也筛选出了虹鳟的 IL-1 基因片断,其预测编码的氨基酸与已报道的虹鳟 IL-1 氨基酸序列具有很高的相似性。

Fujiki 等^[17]以注射了藻酸钠(Sodium alginate)和硬聚葡萄糖(Scleroglucan)混合物的鲤(*Cyprinus carpio*)的腹膜细胞和头肾细胞(藻酸钠可以促进头肾巨噬细胞向腹膜移动并且激活其活性^[18])为检测子,以正常的头肾细胞为驱动子建立差减文库,并从中鉴定与克隆了鲤的 IL-1 β 基因,其与哺乳动物的 IL-1 氨基酸序列同源率为 21.8%~24.7%,与哺乳动物一样也没有信号肽区域。

Fujiki 等^[19]从鲤的腹膜细胞中分离并鉴定了一种细胞因子 M17 的 cDNA,并对其进行了克隆。M17 全长 1 600 bp,编码 215 个氨基酸,N 端含有 1 段长 33 个氨基酸的信号肽。在 3'UTR 存在 7 个 ATTTA 重复序列,该重复序列在多种细胞因子基因和癌基因中是常见的^[20]。BlastP 的结果表明,M17 在氨基酸水平上与鸡的睫状神经营养因子(CNTF)有 25%的同源性,与人的制瘤素 M(OSM)和白血病抑制因子(LIF)有 19%的同源性,而这些因子目前认为都属于 IL-6 亚家族^[19]。尽管 M17 与 CNTF 在核苷酸序列上高度相似,但是基因组成以及编码的蛋白结构、分布却不同,表现在 M17 含有 3 个外显子和 2 个内含子,而 CNTF 有 2 个外显子和 1 个内含子且无信号区;M17 编码的氨基酸含有 7 个半胱氨酸,而 CNTF 只有 1 个半胱氨酸;M17 mRNA 在外周血白细胞和脑的神经系统中都有发

现,而 CNTF 只在神经系统中表达^[19]。M17 含有一个 33 个氨基酸的信号肽且在 3'UTR 含有 7 个 ATTTA 基序,而 CNTF 却没有。与其他的 IL-6 家族的细胞因子相比,M17 的半胱氨酸位置及基因结构与 OSM 和 LIF 更相似,都有 3 个外显子和 2 个内含子,都有信号序列,尽管它们的核苷酸序列相似性(仅为 15%~17%)没有与 CNTF 高。基于此点可以说,M17 在进化中可能与 OSM 而不是与 CNTF 是同一进化簇。Southern 杂交显示,M17 是单拷贝基因,且 M17 在腹膜细胞中较正常的头肾细胞中表达量要大,这说明 M17 的表达是由免疫刺激引起^[19]。鉴于 CNTF 在哺乳动物的免疫系统中有多种重要的功能,因此研究 M17 在鱼类中的功能也是一项十分有意义的工作。

2.2 趋化因子(Chemokine)基因

趋化因子是一类由免疫细胞产生的、具有趋化白细胞作用的超家族细胞因子,能够参与炎症反应的发生。在哺乳动物中,根据多肽链中半胱氨酸残基的排列顺序,可分为 CXC 亚族、CC 亚族、C 亚族和 CX3C 亚族。鱼类中发现的趋化因子主要是 CXC 亚族和 CC 亚族^[21]。

Fujiki 等^[22]从鲤的腹膜细胞差减 cDNA 文库鉴定并克隆出了 2 个基因 L-2 和 L-56。这 2 个基因与已经克隆出的哺乳动物的 IL-8 基因(CXCR1/CXCR2)具有同源性,含有 7 个横跨膜结构区和 1 个 DRY 结构(G 蛋白相关受体家族特征)。L-2 和 L-56 的氨基酸序列相似率为 33.4%,推测这两个基因可能是鲤的两种不同的 IL-8 受体基因。他们还克隆出与虹鳟 CXCR4 相似的 M-135 基因,CXCR4 在鼠的胚胎的生长、B 淋巴细胞增殖、骨髓组织以及心脏的生成中起着重要的作用^[23]。鲤的 CXCR4 基因 M-135 与 Secombes 等^[24]克隆的虹鳟的 CXCR4 以及哺乳动物的 CXCR4 具有高度相似性,说明 CXCR4 在所有脊椎动物的进化中十分保守,CXCR4 及其受体在硬骨鱼的免疫系统中起着关键的作用。

Liu 等^[5]以植物血凝素(Phytohaemagglutinin, PHA)活化过的虹鳟头肾造血细胞为检测子,以未经此处理的对照组虹鳟头肾造血细胞为驱动子,建立了差减 cDNA 文库,并从中分离鉴定出了虹鳟的 CC、CXC 基因。虹鳟的 CC 基因编码的氨基酸序列与鲤的同源率为 44%,与几种哺乳动物的同源率为 20%。虹鳟的 CC 基因与斑点叉尾鲴(*Ictalurus punctatus*)的趋化因子的 EST (Accession no.

BE470467)很相似,它们的氨基酸序列同源性为38%,与斑马鱼(*Danio rerio*)氨基酸序列同源性为33%,在其羧基端(101~191 bp)都有一段由多个丝氨酸、亮氨酸和脯氨酸组成的多肽序列。

Sangrador-Vegas等^[25]应用SSH技术从虹鳟头肾细胞的cDNA文库中鉴定并克隆出一全长cDNA,命名为SSH56。该cDNA编码97个氨基酸,并且含有1段22个氨基酸的前导肽序列,在12、14、38和55位点处各有一个半胱氨酸,与趋化因子相似,与鸡的IL-8亚族的趋化因子9E3⁴的相似性和同源性分别为54.7%和41%,与K60⁵的相似性和同源性分别为54.7%和40.6%。Fujiki等^[26]也从LPS刺激过的虹鳟巨噬细胞系的差减文库中鉴定出一种趋化因子,命名为IL-8nL。IL-8nL与已报道过的虹鳟IL-8基因相似但不完全相同。趋化因子出现在LPS刺激后的巨噬细胞中,因此推测趋化因子在免疫反应中扮演着重要角色。

Inoue等^[27]从佛波酯(phorbol12-myristate 13-acetate, PMA)刺激后的腹膜白细胞建立的差减文库中鉴定出了皱唇鲨(*Triakis scyllia*)的趋化因子基因Trsc-SCYA107、MIP3 α 1和MIP3 α 2。它们的ORF分别为294 bp、300 bp和294 bp,编码97、99和97个氨基酸。皱唇鲨的MIP3 α 1和MIP3 α 2氨基酸序列与人的趋化因子SCYA20的氨基酸序列同源性分别为42.3%和40.0%,Trsc-SCYA107的氨基酸序列与小点猫鲨(*Scyliorhinus canicula*)的Scca-SCYA107、虹鳟的CC型趋化因子CK4A和CK4B的氨基酸序列同源性分别为50.6%、44.2%和42.0%。皱唇鲨的MIP3 α 1和MIP3 α 2与人类的趋化因子基因一样,也含有4个外显子和3个内含子。这3种趋化因子基因在免疫反应中发挥着重要的作用。

2.3 肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)基因

肿瘤坏死因子是能使肿瘤细胞坏死的一类细胞因子,由巨嗜细胞和活化T细胞产生。根据来源和结构不同,可分为TNF- α 和TNF- β 两类。最初人们发现哺乳动物的TNF- α 能增强丝裂原刺激的虹鳟头肾细胞的免疫反应和激活巨噬细胞的活性,而TNF- α 抗体能抑制这种作用,从而间接证明鱼类中存在TNF- α ^[21]。

Liu等^[5]利用SSH技术,通过富含AU序列的cDNA探针,从PHA活化过的虹鳟头肾细胞中成功克隆了TNF基因。虹鳟TNF基因序列的全长1115 bp,编码285个氨基酸,与溪红点鲑(*Salvelini-*

nus fontinalis)TNF基因和人的TNF基因的相似性分别为32%和36%^[28]。虹鳟的TNF基因与虹鳟的TNF基因编码的氨基酸序列有高度的同源性,在polyA尾端都有971个核苷酸的插入位点,在5'端非编码区都有3个ATTTA的重复序列,在3'端则有6个ATTTA的重复序列。ATTTA的重复序列在细胞因子基因、致病基因及趋化激素mRNA 3'端普遍存在;在5'端的作用还不清楚,但在藻青素的一种光依赖基因的5'端存在类似序列,这段序列可以起到抑制转录的作用^[29]。至于虹鳟TNF基因3'端的ATTTA重复序列是否也起抑制转录的作用,还有待于进一步的研究。

2.4 溶菌酶(Lysozyme)基因

溶菌酶基因是生物体内编码具有抗菌性能的基因。溶菌酶是一类能水解致病菌中黏多糖的碱性酶,能选择性地分解微生物的细胞壁而形成溶菌现象,同时又不破坏其他营养组织,具有杀菌、抗肿瘤、止血、消肿、镇痛及加快组织修复等功能,对真菌、寄生虫以及病毒也具有破坏作用。溶菌酶C有两种类型:不与钙结合的溶菌酶C家族和可与钙结合的溶菌酶C家族,而大部分的溶菌酶C都是不与钙结合的^[17]。1974年报道鱼体中溶菌酶的产生与哺乳动物的相似,主要由嗜中性粒细胞和单核细胞产生,少量由巨噬细胞生成。在对淡水鱼和海水鱼的研究中发现,溶菌酶在鱼的肌肉、黏液、血清和某些淋巴组织中广泛分布。^[17]

迄今为止,在草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)、鳙(*Aristichthys nobilis*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、暗纹东方鲀(*Fugu obscurus* Abe)、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、大西洋鲑(*Salmo salar* L)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、香鱼(*Plecoglossidae altivelis*)和真鲷(*Pagrosomus major*)等多种鱼类中均发现溶菌酶基因的存在^[30-37]。Fujiki等^[38]首次利用SSH技术鉴定筛选并克隆出了鲤的溶菌酶C基因。该基因全长666 bp,含有5'和3'非编码区以及编码160个氨基酸的编码区。克隆出的鲤溶菌酶C基因编码的氨基酸序列与人的LECT2的氨基酸序列同源性为48%^[38]。LECT2最初被认为是嗜中性粒细胞的趋化因子,在人和牛的基因中已经得到了克隆,它不像CC和CXC亚类趋化因子一样有4个半胱氨酸位点^[39]。鲤溶菌酶C基因与不与钙结合的溶菌酶C家族的相似性为37.4%~45.0%,与可与钙结合的溶菌酶

C家族的相似性为32.1%~40.5%。然而,由于鲤溶菌酶C基因缺乏3个天冬氨酸位点(101,106和107),而这3个位点在与钙的结合中起着关键的作用^[40],因此鲤溶菌酶C基因属于不与钙结合的溶菌酶C家族。

2.5 NK细胞增强因子(NKEF)基因

NKEF(Natural killer cell enhancing factors)是一类能够增强NK细胞的细胞毒活性,并在氧化应激中保护DNA和蛋白质免受氧化损伤的因子。目前的研究表明,NKEF很保守,从鱼类到哺乳动物都有较高的同源性。

Fujiki等^[22]利用SSH技术,从藻酸钠刺激的鲤腹膜细胞中筛选出一段长975 bp、编码199个氨基酸的鲤NKEF基因。同时发现,藻酸钠刺激引起的NKEF基因的表达可能是氧化还原反应,因为在此过程中检测到硫氧蛋白的产生。在人类基因中,NKEF包括NKEF-A和NKEF-B两种类型,只有NKEF-A有增强NK细胞的细胞毒活性的作用。鲤NKEF与人类NKEF-A的同源性为74.9%,与NKEF-B的同源性为72.9%,因此推测鲤的NKEF既可增强NK细胞的细胞毒活性,又有硫氧还蛋白过氧化物酶(Thioredoxin peroxidase)的活性。

Shin等^[41]利用SSH技术克隆出了鲤的NKEF基因,全长3363 bp,含有6个外显子,5个内含子,ORF为597 bp,编码199个氨基酸,5'UTR为97 bp,3'UTR为100 bp。该基因的外显子和内含子的结合位点与人和小鼠的完全相同,ORF部分内含子插入的位置也与虹鳟和人的相同,因此NKEF在进化上高度保守。鲤的NKEF含有该家族的2个保守的Val-Cys-Pro(VCF)结构域,且发现NKEF在不同组织中的表达水平有显著的差异。

Zhang等^[42]从虹鳟中克隆出了NKEF的cDNA,它具有597 bp的ORF,编码199个氨基酸;5'UTR为53 bp,3'UTR为462 bp,同时还获得了6.5 kb的NKEF基因全序列,它由6个外显子组成,与人和小鼠的NKEF基因结构高度相似。

2.6 补体(Complement component)基因

补体基因是一类能够编码大量的互相依赖的补体分子,从而组成脊椎动物体内完善的补体系统的基因组。补体系统是先天免疫系统中的中心辅助系统,是所有脊椎动物共有的保护系统。

Bayne等^[43]从以灭活的鳃弧菌注射的虹鳟肝和正常的虹鳟肝建立的差减文库中,检测出许多与

抗弧菌相关的免疫基因,其中补体成分占多数,如C3-1、C7、Bf-2、B/C2、C1等补体因子。在此差减文库中鉴定出的补体成分C3-1和Bf-2与已经报道的虹鳟C3-1和Bf-2的氨基酸序列的同源性分别为99%和98%,接近100%,这可能是在PCR过程中由于错配而造成的微小差异。一个命名为LⅢ-16的克隆与B/C2-B有很大的相似性,B/C2-B是一种在鲤中发现的类似于B/C2分子的细胞因子。在补体反应过程中,一些激活补体的成分表达增加,同时一些抑制因子如阻止细胞衰退的蛋白的表达也会增加。一个被命名为DRTP1的克隆,与犰(Calithrix sp.)的CD59有30%的同源性,与眼镜蛇(Naja naja)毒液中存在的一种磷脂酶A2抑制剂的同源性更高,达到34%。CD59是一种细胞表面蛋白,能够阻止膜攻击性复合体的形成,从而抑制补体造成的细胞破坏。DRTP1、CD59和磷脂酶A2抑制剂分子中的12个半胱氨酸中,有10个是高度保守的,推测鲤的DRTP1是CD59的同源物,在急性反应期补体系统中起着重要的调控作用,抑制补体造成的细胞破坏。在差减文库中也发现与前列腺素DPGD同源的基因片段,是一种血小板蛋白抑制剂,在哺乳动物的急性反应期中的作用已经研究得很清楚,然而在虹鳟中还有待于找出其全长cDNA,进一步对其性质进行研究才可得知。

Alonso等^[44]应用SSH技术,从注射poly IC(一种高效的干扰素诱导剂)的鲑和注射PBS的对照组鲑的肾、脾和肝建立的双向文库中鉴定出CD59、C4、C3/C5、C3-1、H因子和C9等许多补体成分基因,并首次在鱼类中发现了转化酶基因CD59和C3/C5,说明补体在鱼的非特异性免疫中发挥着重要的作用。

Straub等^[45]从受两种不同环境影响的牙鲈肝组织提取的mRNA建立的双向差减文库中也筛选到许多补体因子基因,如C-3、C-7、H因子及Bf/C2因子基因等。并且筛选到急性期反应物如纤维蛋白、巨噬细胞C型血凝素、阿朴脂蛋白、细胞色素氧化酶,它们可以激活补体的活性。Bayne等^[42]也从注射了弧菌提取物的虹鳟肝中发现了类似的物质,这些转录产物可激活I-b因子和C3b/C4b的活性。

Fujik等^[46]从虹鳟的头肾细胞的差减文库中鉴定出虹鳟的补体C5aR,其cDNA长1679 bp,共编码350个氨基酸,与哺乳动物C5aR的同源性为29.0%~31.5%。虹鳟的C5aR与哺乳动物的一

样,也有7个跨膜区,在起始密码子上游的12 bp处都有一段1.9 kb的内含子区域。Tsoi等^[47]从注射了杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*) A449株的大西洋鲑的差减文库中鉴定出许多免疫基因,并鉴定出不少补体成分如C3-1、C7和C9等。

2.7 干扰素(Interferon, IFN)基因

干扰素是一类干扰病毒复制的细胞因子,在细胞和机体受到病毒感染,或受核酸、细菌内毒素、促细胞分裂素等诱导时,由受体细胞分泌。TNF是一种具有广谱抗病毒活性的糖蛋白,分子量为25~38 kD,对细胞生长和分化、细胞和机体的免疫有着很重要的调节活性。IFN是目前所知的机体防御反应中出现最早的细胞功能调节基因,在病毒感染几小时之内就开始发挥作用^[3],目前已经在多种水产养殖鱼类体内检测到。鱼类IFN具有广谱抗病毒活性,对鱼类和非鱼类病毒、RNA和DNA病毒都有抑制作用。虽然在有些组织和细胞中能检测到IFN的组成型表达,但在正常情况下,生物机体一般只在受到病毒和细菌感染,或用Poly IC、促细胞分裂素等诱导剂人工诱导时才能分泌IFN^[48]。

在相当长的时间内,在低等脊椎动物中,只发现受到病毒感染后的细胞能产生与哺乳类IFN类似的抗病毒活性物质,却一直没有成功克隆IFN基因或纯化出IFN蛋白。Mx基因是最先鉴定出的鱼类的IFN系统基因。Alonso等^[44]报道用SSH技术筛选到代表虹鳟*IFI54*、*IFI56*、*IFI58*、*ISG15*等基因的EST,但是没有克隆到它们的全长cDNA序列以进行最后的分析鉴定。在此之前,通过基因组结构分析,在药物诱导的金鱼肾损伤系统中鉴定出了*ISG15*基因^[49]。另外还分析鉴定了斑马鱼(*Danio rerio*)和河豚(*Fugu rubripes*)的ADAR基因^[50]。以上的这些结果都是一些零星报道,而且大多没有研究它们与IFN或病毒诱导的直接关系。

Alonso等^[44]应用SSH技术从注射poly IC的鲑鱼的差减库中鉴定出干扰素诱导蛋白(15 kD、54 kD、56 kD和58 kD),这是首次在鱼类中发现干扰素蛋白。近年来许多实验室开展了草鱼的IFN组织细胞来源及其免疫生物学功能的研究。江育林等^[51]对草鱼细胞被病毒诱导后产生的抗病毒因子的生物特征、理化特征进行研究;此后,邵健忠等^[52-53]对用病毒和PHA等诱导剂诱导的草鱼产生的IFN活性物质进行了特性研究。张义兵等^[4,54]在利用紫外线灭活的草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhage vi-

rus, GCHV)诱导鲫鱼(*Carassius auratus* L)囊胚培养细胞(CAB)产生IFN的基础上,应用SSH及其他基因克隆技术,建立了研究鱼类抗病毒相关基因和免疫相关基因的细胞模型,突破了研究系统及其相关技术瓶颈,并从该细胞系统中鉴定了许多重要的IFN系统基因,取得了一系列新的进展。在用紫外线灭活的GCHV诱导的CAB细胞系统中,不仅成功克隆了鲫鱼的IFN基因、IFN信号传递基因、IFN表达的调控基因,同样也鉴定和克隆了在哺乳类IFN系统中已经被证明发挥抗病毒作用的重要基因,包括*STAT1*、*JAK1*、*IRFMx1*、*Mx3*、*PKR*、*Viperin*、*IFI56*、*CaIFN*、*IFI58*和*ISG15*等^[55-56]。由于这些基因是在病毒诱导下在能够产生IFN的CAB细胞中被鉴定出来,因此可以推测这些基因的表达与病毒感染和细胞IFN的表达有直接关系。事实上,进一步的研究也表明,这些基因不仅受病毒诱导表达,而且这些基因在IFN诱导的CAB中也能够快速表达,证实了它们就是鱼类IFN诱导的基因^[55-56]。张义兵等^[55]还克隆出了鲫鱼*STAT1*、*CaIFN*等基因的全长cDNA。*STAT1*的cDNA全长为2 157 bp,编码718个氨基酸,5'UTR为70 bp,3'UTR为702 bp。*CaIFN*的cDNA全长1 226 bp,共编码180个氨基酸,并且含有1个22个氨基酸的信号肽,在3'UTR有10个ATTTA框,推测其可能在信号的快速传递中起作用。

2.8 急性期蛋白(Acute phase proteins, APPs)基因

机体在病原菌感染、炎症和组织损伤等发生后的短时间内,会发生一系列的反应,称为急性期反应(Acute phase reaction),参与急性期反应的蛋白质,称为急性期蛋白(APPs)^[57]。在哺乳动物中,急性反应期产生的Toll样受体、诱导促炎性细胞因子(Pro-inflammatory cytokines)以及CAAT增强子结合蛋白(CCAAT/enhancer-binding proteins, C/EBPs)等调控因子,与急性期蛋白的产生是密切相连的。机体在受到感染时,Toll样受体能够识别微生物的组分,从而感受到病原菌的侵袭^[58]。受体做出反应后促使机体产生诱导促炎细胞因子IL-1、IL-6及TNF等(它们是急性期蛋白的重要诱导物)^[59],这些诱导促炎细胞因子反过来又刺激急性反应基因转录因子C/EBPs(如C/EBPB和/EBPD)的产生^[60],促使其转录。在哺乳动物和小鼠中,急性期蛋白已被大量研究,在鱼类中也已鉴定出一些急性期

蛋白基因^[61]。

Lin 等^[62]首次报道了斑马鱼的急性期蛋白基因。他们从杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)感染的斑马鱼的两个差减 cDNA 文库中分别得到 536 个和 358 个差减 ESTs。序列分析后发现,许多基因与哺乳动物的急性期蛋白基因如外源凝集素基因(Lectins)、抗菌肽基因(Antiproteases)、Toll 样受体基因以及一些补体基因有高度的同源性。他们鉴定出一种与人类 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和小鼠的 SAP(与 CRP 同族)类似的急性期蛋白基因。该基因编码 232 个氨基酸,含有一个穿透素(Pentraxin)信号区。其编码的氨基酸与 CRP 和 SAP 的相似性为 56%,与 SAP 有 37%的同源性,与 CRP 有 35%的同源性,但是尚未能确定它是属于 CRP 亚族还是 SAP 亚族。同时还鉴定出另外一种在炎症细胞中发挥着重要作用的急性期蛋白 SAA。Fujiki 等^[17]也从鲤的头肾细胞和腹膜细胞中筛选出鲤的 SAA,其 cDNA 全长为 621 bp,含有 5' UTR 和 3' UTR,共编码 123 个氨基酸。Lin 等^[62]还首次在鱼类中鉴定出一种新型的 APP 的急性期蛋白 LECT2,与小鼠 LECT2 的氨基酸序列同源性为 54%,相似性为 72%;在受到杀鲑气单胞菌感染后,其表达量增加至原来的 1 344.6 倍。LECT2 曾被报道为一种嗜中性粒细胞的趋化因子^[63],之后报道其在肝的再生^[64]、致癌^[65]以及 NKT 细胞的自我平衡^[66]中起重要作用。Lin 等^[62]首次报道了 LECT2 在受到细菌感染后的表达量急剧增加,说明其在抵抗病原菌的感染中发挥着重要的作用,并推测 LECT2 可能在炎症反应早期中作为嗜中性粒细胞的趋化因子发挥重要作用,但 LECT2 在斑马鱼免疫反应的急性反应期中的真正功能和作用机制尚需进一步的研究。

3 结论与展望

免疫相关基因在鱼类的免疫和应激反应中发挥着重要的作用。近年来,已经利用 SSH 技术和其他分子生物学技术鉴定出了不少鱼的免疫相关基因,如白细胞介素、趋化因子、肿瘤坏死因子、溶菌酶、NKEF、补体、干扰素及急性期蛋白基因等,对它们的基因结构和生理学功能也进行了较为深入的研究,这些研究成果不仅丰富了免疫学的内容,对鱼病的防治也具有重要的意义。分离克隆鱼类的免疫基因,阐明抗病相关基因的表达调控规律,揭示鱼类抗

病力的分子遗传基础,为选育抗病力强的养殖鱼类新品种提供更好的理论基础。

参考文献:

- [1] 陈立祥,张学文,肖调义,等. 人 α -干扰素基因在转基因草鱼中的表达[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2001,27(3): 177-178.
- [2] 张义兵,张奇亚,桂建芳. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定[J]. 水生生物学报,2000,7(3):97-101.
- [3] 张义兵,俞小牧. 鱼类干扰素的研究进展[J]. 中国水产科学,2000,7(3):97-101.
- [4] 张义兵,张奇亚,徐德全,等. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因[J]. 科学通报,2003,48(5):457-463.
- [5] Liu L, Fujiki K, Dixon B, et al. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNT decoy receptor using cDNA fragments containing AU-rich elements[J]. Cytokine, 2002, 17(2):71-81.
- [6] 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(12):6 025-6 030.
- [7] Akopyants N S, Fradkov A, Diatchenko L, et al. PCR based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(2):13 018-13 113.
- [8] Winstanley C. Spot the difference: applications of subtractive hybridization to the study of bacterial pathogens[J]. J Med Microbiol, 2002, 51(6):459-467.
- [9] 胡昌华. 抑制消减杂交技术与基因克隆[M]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(6):289-294.
- [10] Wang J, Wright M B, Li C, et al. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes[J]. BMC Genomics, 2002, 3(1):12.
- [11] 龙华, 郑英. 鱼类抗病基因的研究进展[J]. Chin Med Res Clinic, 2006, 4(1):32-47.
- [12] Caspi R R, Avtalion R R. Evidence for the existence of an IL-2-like lymphocyte growth promoting factor in a bony fish (*Cyprinus carpio*)[J]. Dev Comp Immunol, 1984, 8(1):51-60.
- [13] Bird S, Zou J, Secombes C J, et al. Evolution of interleukin-1 beta gene in vertebrates[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(6):483-502.
- [14] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin-1 beta from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals no evidence of an ICE cut site[J]. Cytokine, 1999, 11, 552-560.
- [15] Sangrador-Vegas A, Martin S A M, O'Dea P G, et al. Cloning and characterization of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin-1 receptor cDNA[J]. Eur J Biochem, 2000, 267, 7 031-7 037.

- [16] Liu L, Fujiki K, Dixon B, et al. Cloning of a novel rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) CC chemokine with a fractalkine-like stalk and a TNF decoy receptor using cDNA fragment containing AU-rich element[J]. *Cytokine*, 2002, 17(2): 71-81.
- [17] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin- β , high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10(3): 229-242.
- [18] Fujiki K, Yano T. Effects of sodium alginate on the nonspecific defence system of the common carp (*Cyprinus carpio*, L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1997, 7: 417-427.
- [19] Fujiki K, Nakao M, Dixon B. Molecular cloning and characterisation of a carp (*Cyprinus carpio*) cytokine-like cDNA that shares sequence similarity with IL-6 subfamily cytokines CNTF, OSM and LIF[J]. *Dev Comp Immunol*, 2003, 27: 27-136.
- [20] Wennborg A, Sohlberg B, Angerer D, et al. A human RNase E-like activity that cleaves RNA sequences involved in mRNA stability control[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92; 7 322-7 326.
- [21] 潘学霞, 邵健忠, 项黎新, 等. 鱼类中几种新型免疫因子的进展[J]. *水产学报*, 2005, 29(2): 264-269.
- [22] Fujiki K, Hin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization[J]. *Immunogenetics*, 1999, 49(10): 909-914.
- [23] Ma Q, Jones D, Borghesani P R, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95; 9 448-9 453.
- [24] Secombes C J, Zou J, Daniels G, et al. Rainbow trout cytokine and cytokine receptor genes[J]. *Immunol Rev*, 1998, 166, 333-340.
- [25] Sangrador-Vegas A, Lenington J B, Smith T J. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization[J]. *Cytokine*, 2002, 21, 17(2): 66-70.
- [26] Fujiki K, Gauley J, Dixon B, et al. Genomic cloning of novel isoforms of the rainbow trout interleukin-8[J]. *Immunogenetics*, 2003, 55: 126-131.
- [27] Inoue Y, Saito T, Endo M, et al. Molecular cloning and preliminary expression analysis of banded dogfish (*Triakis scyllia*) CC chemokine cDNAs by use of suppression subtractive hybridization[J]. *Immunogenetics*, 2005, 56: 722-734.
- [28] Bobe J, Goetz F W. A tumor necrosis factor decoy receptor homologue is up-regulated in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ovary at the completion of ovulation[J]. *Biol Reprod*, 2000, 62(2): 420-426.
- [29] Agrawal G K, Kato H, Asayama M, et al. An AU-box motif upstream of the SD sequence of light-dependent psbA transcripts confers mRNA instability in darkness in cyanobacteria [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29; 1 835-1 843.
- [30] Hikima J, Minagawa S, Hirono I, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein [J]. *Biochem Biophys Acta*, 2001, 1 520(1): 35-44.
- [31] Paulsen S M, Engstad R E, Robertsen B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2001, 11(1): 23-37.
- [32] Chong S, Kontaraki J, Bonifer C, et al. A functional chromatin domain does not resist X chromosome inactivation; silencing of clys correlates with methylation of a dual promoter-replication origin[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(1 3): 4 667-4 676.
- [33] Yang Z, Nielsen R. Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages[J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 19(6): 908-917.
- [34] 安利国, 冯程强, 邢维贤, 等. 灭活疫苗对鲤鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用[J]. *山东师大学报(自然科学版)*, 1999, 14(2): 175-179.
- [35] 曾丹, 周洪琪. 不同添加剂对暗纹东方纯生长和脾脏溶菌酶活性的影响[J]. *饲料广角*, 2002, 11: 18-19.
- [36] 陈昌福, 罗宇良, 薄冰, 等. 饲养水温对草鱼溶菌酶活性的影响[J]. *中国水产科学*, 1996, 3(3): 24-30.
- [37] 梁小成. 几种淡水养殖鱼类血清溶菌酶活性的初步观察[J]. *水产科学*, 1993, 12(2): 15-17.
- [38] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, gli maturation factor beta, CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2000, 10(7): 643-650.
- [39] Yamagoe S, Mizuno S, Suzuki, K. Molecular cloning of human and bovine LECT2 having a neutrophil chemotactic activity and its specific expression in the liver [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1 396, 105-113.
- [40] Nitta K, Sugai S. The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 182: 111-118.
- [41] Shin D, Fujiki K, Nakao M, et al. Organization of the NKEF gene and its expression in the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(7): 597-606.
- [42] Zhang H, Evenhuis J P, Thorgaard G H, et al. Cloning, characterization and genomic structure of the natural killer cell enhancement factor (NKEF)-like gene from homozygous clones of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(1): 25-35.
- [43] Bayne C J, Gerwick L, Fujiki K, et al. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means Suppression Subtractive Hybridization [J]. *Dev Comp Immunol*, 2001, 25(3): 205-217.
- [44] Alonso M, Leong J A. Suppressive subtraction Libraries to identify interferon-inducible genes in fish [J]. *Mar Biotechnol*, 2002, 4(1): 74-80.
- [45] Straub P F, Higham M L, Tanguy A, et al. Suppression Sub-

- tractive Hybridization cDNA Librarie to Identify Differentially Expressed genes from contrasting fish habitats[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6(4): 386—399.
- [46] Fujiki K, Liu L, Dixon B, et al. Molecular cloning and characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) C5a anaphylatoxin receptor[J]. Immunogenetics, 2003, 55: 640—646.
- [47] Tsoi S C M, Ewart K V, Penny S, et al. Identification of immune-relevant genes from Atlantic salmon using suppression subtractive hybridization[J]. Mar Biotechnol, 2004, 6, 199—214.
- [48] Zou J, Grabowski P S, Cunningham C, et al. Molecular cloning of interleukin-1 β from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reveals no evidence of an ICE cut site[J]. Cytokine, 1999, 11: 552—560.
- [49] Liu M, Reimschuessel R, Hassel B A. Molecular cloning of the fish interferon stimulated gene, 15 kDa (ISG15) orthologue; a ubiquitin-like gene induced by nephrotoxic damage[J]. Gene, 2002, 298: 129—139.
- [50] Slavov D, Crnogorac-Jurcevic T, Clark M, et al. Comparative analysis of the DRADA A-to-I RNA editing gene from mammals, pufferfish and zebrafish[J]. Gene, 2000, 250: 53—60.
- [51] 江育林, 李正仗. 病毒感染草鱼细胞产生干扰素物质的研究[J]. 病毒学报, 1991, 7(1): 30—35.
- [52] 邵健忠, 钱凯先, 项黎新, 等. 病毒诱导草鱼产生干扰素活性因子的研究[J]. 病毒学报, 1998, 14(4): 346—351.
- [53] 邵健忠, 项黎新. PHA 体外诱导草鱼白细胞产生 γ -干扰素的研究[J]. 海洋与湖沼, 2001, 32(2): 117—124.
- [54] 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.
- [55] 张义兵. 鲫鱼干扰素系统基因的克隆鉴定及其特征分析[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2003.
- [56] Zhang Y B, Li Q, Gui J F. Differential expression of two *Carassius auratus* Mx genes in cultured CAB cells induced by grass carp hemorrhage virus and interferon[J]. Immunogenetics, 2004, 56: 68—75.
- [57] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation[J]. N Engl J Med, 1999, 340: 448—454.
- [58] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4, 499—511.
- [59] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis[J]. Nature, 2002, 420, 885—891.
- [60] Poli V. The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions[J]. J Biol Chem, 1998, 273, 29 279—29 282.
- [61] Bayne C J, Gerwick L. The acute phase response and innate immunity of fish[J]. Dev Comp Immunol, 2001, 25, 725—743.
- [62] Lin B, Chen S W, Cao Z, et al. Acute phase response in zebrafish upon *Aeromonas salmonicida* and *Staphylococcus aureus* infection: Striking similarities and obvious differences with mammals[J]. Mol Immunol, 2007, 44: 295—301.
- [63] Yamagoe S, Yamakawa Y, Matsuo Y, et al. Purification and primary amino acid sequence of a novel neutrophil chemotactic factor LECT2[J]. Immunol Lett, 1996, 52(1): 9—13.
- [64] Sato Y, Watanabe H, Kameyama H, et al. Changes in serum LECT 2 levels during the early period of liver regeneration after adult living related donor liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2004, 36, 2 357—2 358.
- [65] Ovejero C, Cavard C, Perianin A, et al. Identification of the leukocyte cell-derived chemotaxin 2 as a direct target gene of beta-catenin in the liver[J]. Hepatology, 2004, 40: 167—176.
- [66] Saito T, Okumura A, Watanabe H, et al. Increase in hepatic NK T cells in leukocyte cell-derived chemotaxin 2-deficient mice contributes to severe concanavalin A-induced hepatitis[J]. J Immunol, 2004, 173: 579—585.

Suppression subtractive hybridization and its application in cloning immune-related genes from cultured fish

WANG Chuan-juan, ZHANG Xiao-hua, JIA Ai-rong

(Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Suppression subtractive hybridization (SSH) is one of the most powerful methods for isolating differentially expressed transcripts, and it has been employed in identification of immune genes of hosts in relation to infections. To date, researchers have applied SSH method to investigate many differential expressed genes in inflammatory response, including genes encoding interleukins (ILs), chemokine, tumor necrosis factor (TNF), lysozyme, natural killer cell enhancing factors (NKEF), complement, interferon (IFN), acute phase proteins (APPs), etc, and the structure and function of the genes have been studied. The screening for immune-related functional genes in fish is very important for identifying the molecular mechanism for fish disease resistance. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 504—512]

Key words: suppression subtractive hybridization; aquacultural fish; gene clone; immune-related gene

Corresponding author: ZHANG Xiao-hua. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn