

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00023

黄鳝性腺抑制差减文库的构建和分析

曲宪成¹, 尚晓莉¹, 程翠¹, 曲学伟², 张勇¹, 张开岳¹, 蒋骄云¹

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;
2. 烟台市牟平区渔业技术服务中心, 山东 烟台 264100

摘要: 应用抑制性差减杂交技术构建了黄鳝(*Monopterus albus*) IV 期卵巢和间期性腺的差减 cDNA 文库。正向差减杂交以间期性腺为试验方, IV 期卵巢为驱动方; 反向差减杂交以 IV 期卵巢为试验方, 间期性腺为驱动方。将获得的差减 cDNA 片段连接质粒载体, 然后转化大肠杆菌 DH5 α , 最后获得的正、反向差减文库分别含 461、678 个重组子。经 PCR 扩增鉴定插入片段范围为 200~2 000 bp。随机选取正、反文库共 100 个阳性克隆测序分析, 得到 90 个有效基因片段, 与 GenBank 进行 BLASTx 和 BLASTn 同源比对。进一步从文库中选取 2 个基因用于半定量 RT-PCR, 对文库质量进行验证。结果表明, 所建文库能够达到富集这两期性腺差异表达基因的目的。黄鳝性腺差减文库的构建, 为进一步分离、鉴定黄鳝性腺发育和性逆转的相关基因奠定了基础。[中国水产科学, 2011, 18(1): 23-28]

关键词: 黄鳝; 性腺; 抑制性差减杂交; 差减 cDNA 文库

中图分类号: S917 文献标识码: A 文章编号: 1005-8737-(2011)01-0023-06

黄鳝(*Monopterus albus*), 俗称鳝鱼, 属于硬骨鱼纲、合鳃目、合鳃科、黄鳝属, 广泛存在于亚洲地区, 中国仅产 1 种。其体型细长, 形状似蛇或鳗, 营养价值极高。长期以来, 由于野生黄鳝被过量捕捉, 及其生活的水域环境受到严重破坏, 导致黄鳝自然资源下降, 养殖所需苗种短缺。

在黄鳝的生活史中存在着特殊的生殖发育现象——自然性逆转^[1]。一些学者先后分别通过活体取材、组织学结构观察等方法对黄鳝的生殖发育过程进行了研究^[2-5], 认为第一次性成熟发育周期内黄鳝为雌性发育, 雌性性成熟产卵后, 生殖腺内卵细胞败育, 卵巢结构逐步退化, 同时雄性生殖细胞开始发育, 通过雌雄间性阶段过渡到雄性发育, 黄鳝个体生殖发育是单方向进行的。

黄鳝性逆转在基因水平上的调控以及性别决定基因一直是研究者们关注的热点。而性别决定又是一个涉及进化时空的多基因活动的复杂调控过程^[6-7]。目前, 已知的与性别决定和分化有关的

主要基因有: *SRY/sry*、*vasa*、*Dmrt1*、*Sox*、*Dax-1*、*SF-1*、*MIS*、*WT-1*、*AMH* 等^[8-9]。而关于这些基因在黄鳝中的表达情况, 许多学者也做了部分研究, 但到目前也没有明确黄鳝性逆转的机制。

抑制差减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)^[10]技术是一种简单、有效产生高度富集差异表达基因的方法, 与 mRNA 差异显示 PCR(DD-PCR)和代表性差异分析(RDA)相比, 具有效率高、敏感度高、假阳性率低等优点^[11], 因此该技术在分子生物学各个领域得到广泛的应用。

本研究利用 SSH 筛选黄鳝性腺中与性逆转相关的差异表达基因, 在此基础上分析黄鳝性逆转过程中相关基因的作用机制, 为进一步研究黄鳝性逆转的内分泌调控机制提供理论基础; 同时拟通过生物学等方法改变或控制黄鳝的性别, 来延长黄鳝雌性期或者使其终生为雌性, 以解决黄鳝苗种缺乏的问题。

收稿日期: 2009-12-10; 修订日期: 2010-03-01.

基金项目: 上海市重点学科建设项目(S30701).

作者简介: 曲宪成(1965-), 副教授, 硕士生导师, 主要从事水生动物生理研究. Tel: 021-61900418; E-mail: xcqu@shou.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 实验所用黄鳍购于上海市崇明岛三沙洪农贸市场, 健康状况良好。

1.1.2 主要试剂 SMARTTM PCR cDNA Synthesis kit 和 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction kit 购于 Clontech 公司; DNA Fragment Purification kit、pMD18-T 载体、100 bp DNA marker、IPTG、X-gal 和琼脂糖购自 Takara 工程(上海皓嘉)有限公司; 酚-氯仿-异戊醇试剂和氯仿-异戊醇试剂购自上海生工生物工程有限公司; D15000+2000 marker、DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司; 氨苄青霉素、EB、蛋白胨和琼脂购自美著生物技术有限公司; Trizol 购自 invitrogen; 所用引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 黄鳍性腺发育时期的确定 称取黄鳍体质量后, 用颈椎切断法处死黄鳍, 打开腹腔, 观察并取其完整性腺组织, 剪取长度约 0.5 cm 样品用 Bouin 氏液固定, 用于组织切片观察, 以确定各性腺发育时期; 其余部分装入 1.5 mL 离心管, 放入液氮中速冻, 待样品取完后, 转入-80℃保存备用。

1.2.2 样品总 RNA 提取 选取卵巢发育 IV 期和间期性腺作为实验对象。从-80℃冰箱中取出存放于 1.5 mL 离心管的组织, 称取 100 mg 样本立即加入 Trizol reagent 试剂 1 mL, 匀浆后, 经氯仿抽提、异丙醇沉淀后, 加入适量 0.1%DEPC 水溶解总 RNA, 并对 RNA 进行定性定量分析。

1.2.3 合成双链 cDNA 按照 SMARTTM PCR cDNA Synthesis kit 的使用说明进行。主要过程如下: 1 μ g 总 RNA 在 CDS 引物和 SMART 寡聚核苷酸引物存在下, 70℃ 孵育 2 min, 然后加入逆转录酶和 dNTP 后 42℃ 孵育 1 h。结束后, 取稀释后的第一链 cDNA 1 μ L, 加入 10 μ L 10 \times Advantage 2 PCR buffer、2 μ L 50 \times dNTP、2 μ L 5'PCR Primer II A 和 2 μ L 50 \times Advantage 2 polymerase mix, 在 100 μ L 体系中进行 PCR 反应。反应条件如下: 95℃, 1

min; 95℃, 15 s; 65℃, 30 s; 68℃, 6 min, 18 个循环。最后, 所合成的双链 cDNA 用 Takara 公司提供的 DNA Fragment Purification kit 纯化。

1.2.4 抑制性差减杂交和差减效率检测 具体操作按照 Clontech 公司提供的 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction kit 使用说明进行。以黄鳍间期性腺 cDNA 为试验方, IV 期卵巢 cDNA 为驱动方, 所构建的文库为正向文库; 反之则为反向文库。

用黄鳍 β -actin 正向引物: 5'-ATCGCCGCA-CTCGTTGTTGAC-3'; 反向引物: 5'-CCTGTTGGCTTTGGGGTTC-3', 对差减 cDNA 文库进行差减效率检测。PCR 反应条件如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃, 30 s; 58.2℃, 30 s; 72℃, 45 s, 38 个循环。同时分别在第 18、23、28、33、38 个循环取 5 μ L 反应产物电泳, 比较该基因在杂交前后的 cDNA 丰度, 以及检测差减杂交的效率。

1.2.5 差减文库的构建 将第 2 轮 PCR 产物纯化后连接到 pMD18 载体, 然后经转化大肠杆菌 DH5 α 、平板培养构建黄鳍性腺的正向和反向差减文库。

1.2.6 EST 测序及分析 随机挑选阳性克隆送上海杰李生物公司进行测序。去除两端载体后将其与 GenBank 进行 BLASTx 和 BLASTn 同源比对, 比对结果进行功能注释和分类。

1.2.7 差异表达基因的半定量分析 从正、反向文库中分别挑选 1 个基因, 根据 EST 序列设计引物, 并以 β -actin 为内参, 利用半定量 RT-PCR 技术检测差异表达基因在黄鳍 IV 期卵巢和间期性腺的表达水平。

2 结果与分析

2.1 黄鳍性腺发育时期的选择

通过石蜡切片确定所采黄鳍性腺的发育时期, 根据黄鳍性腺发育各期的特点, 选取黄鳍发育 IV 期卵巢和间期性腺组织进行抑制差减杂交。这 2 个时期样本的组织结构如图 1 所示。由图可明显看出, 在卵巢发育 IV 期并没有精巢组织发生, 而在间期性腺中出现了初级精母细胞, 选用这 2 个发育时期的组织进行比较符合本实验的设计要求。

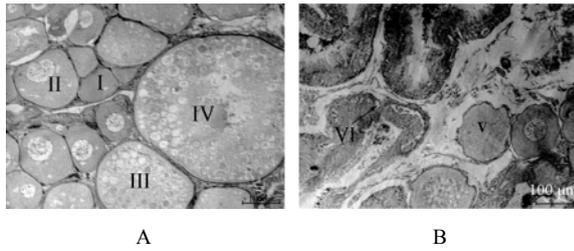


图 1 黄鳍性腺组织切片图

A: IV 期卵巢; B: 间期性腺. I: I 时相卵泡; II: II 时相卵泡; III: III 时相卵泡; IV: IV 时相卵泡; V: 发育的卵泡; VI: 初级精母细胞.

Fig.1 Gonad tissue slice of *Monopterus albus*

A: ovary of IV stage; B: ovotestis. I: ovary follicle of stage I; II: ovary follicle of stage II; III: ovary follicle of stage III; IV: ovary follicle of stage IV; V: aborted ovary follicle; VI: primary spermatocyte.

2.2 cDNA 的合成和 Rsa I 酶切

如图 2 所示, 由总 RNA 合成得到的 cDNA 为弥散状条带, 片段长度在 100 bp~10 kb 之间(泳道 1 和 3); 经 Rsa I 酶切后, 弥散状条带变小, 片段长度为 100 bp~3 kb (泳道 2 和 4)。

2.3 消减效率的验证

消减效率的高低是构建高质量消减文库的关键。通过比对黄鳍 β-actin 在消减和未消减 PCR 产物中的表达量来分析所构建文库的消减效率。凝胶电泳显示, 正向文库(Fs)经过消减后的样本

需要多 5 个循环才能扩增出明显的条带(图 3); 同样, 反向文库(Rs)也需要多 5 个循环才能扩增出明显的条带, 这表明经过 2 次杂交和 2 次抑制 PCR, 已成功地将驱动方和试验方的共有序列大幅度消减, 同时也显示所构建的文库有较高的消减效率。

2.4 抑制性差减文库的建立及分析

差减后的第 2 次 PCR 扩增产物经纯化、连接、转化、平板培养后, 正、反向差减 cDNA 文库分别获得 461 和 678 个重组子。随机挑选 100 个正

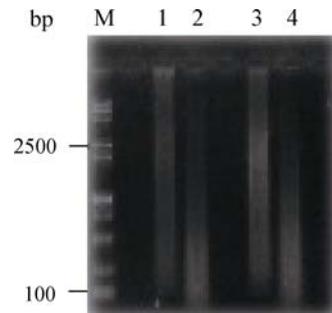


图 2 Rsa I 酶切前后的黄鳍性腺 cDNA 琼脂糖凝胶电泳图

M: D15000+2000 marker; 1: 间期性腺 cDNA; 2: 间期性腺酶切后 cDNA; 3: IV 期卵巢 cDNA; 4: IV 期卵巢酶切后 cDNA.

Fig. 2 Agar electrophoresis gel of *Monopterus albus* gonad cDNA before and after *Rsa I* enzyme digestion

M: D15000+2000 marker; lane 1: ovotestis cDNA; lane 2: ovotestis cDNA after *Rsa I* digestion; lane 3: IV ovary cDNA; lane 4: IV ovary cDNA after *Rsa I* digestion.

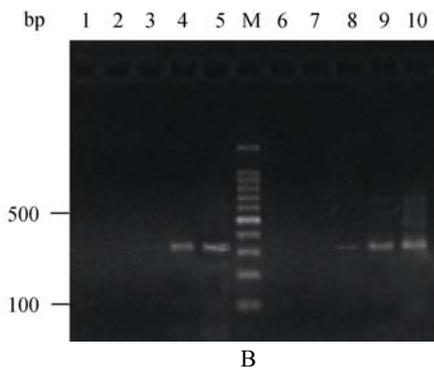
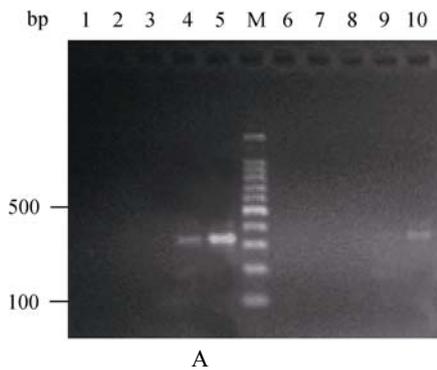


图 3 PCR 检测 β-actin cDNA 的消减效率电泳图

A: 以间期性腺为试验方; 1、2、3、4、5: 未差减杂交; 6、7、8、9、10: 差减杂交. B: 以 IV 期卵巢为试验方; 1、2、3、4、5: 差减杂交; 6、7、8、9、10: 未差减杂交. 1、6: 18 个循环; 2、7: 23 个循环; 3、8: 28 个循环; 4、9: 33 个循环; 5、10: 38 个循环; M: 100 bp marker.

Fig. 3 Agar electrophoresis gel subtraction efficiency of β-actin cDNA between subtracted and un-subtracted cDNAs detected by PCR. A: ovotestis as tester; 1, 2, 3, 4 and 5 are un-subtracted products; 6, 7, 8, 9 and 10 are subtracted products. B: IV ovary as tester; 1, 2, 3, 4 and 5 are subtracted products; 6, 7, 8, 9 and 10 are un-subtracted products. Lane 1, 6: 18 cycles; lane 2, 7: 23 cycles; lane 3, 8: 28 cycles; lane 4, 9: 33 cycles; lane 5, 10: 38 cycles; M: 100 bp marker.

向文库克隆与 100 个反向文库克隆进行 PCR 检测, 结果显示, 插入片段长度不一, 主要分布在 200~2 000 bp 之间(图 4)。

2.5 EST 测序及分析

从正、反差文库中分别随机挑选 50 个阳性克隆进行测序, 获得 90 条 EST。对这 90 个 EST 序列经 GenBank 检索进行比较分析, 发现其中 43 个片段与 GenBank 登录的基因有较高的同源性, 其余 47 条序列尚无同源序列。Fs 含有精巢特异表达序列 12 蛋白、高渗富甘氨酸蛋白、精子鞭毛蛋白、 $\beta 2$ 微球蛋白和细胞 s 相激酶相关蛋白等相关 EST, 这些基因可能与黄鳍精巢的构建和发育相关。Rs 中含有含乙二醛域蛋白质 5、透明带蛋白、cullin 1a、spiggin 基因、琥珀酸脱氢酶亚基和 DNA 引发酶亚基等相关 EST。部分同源序列比对结果见表 1。

2.6 差异表达基因的半定量表达分析

利用精巢特异表达序列 12 蛋白(Fs11)和 spiggin(Rs11)基因特异性引物, 半定量 PCR 分析其在 IV 期卵巢和间期性腺中的表达, 结果如图 5 所示。从图中可以看出 2 条差异片段在黄鳍卵巢和间期性腺中的差异表达极其显著, 与抑制差减结果一致。

3 讨论

本研究通过石蜡切片确定所采用样本的性腺发育时期, 结果显示, 卵巢在发育至 IV 期后卵黄

才会大量积累, 卵巢接近成熟状态。而且在 IV、V、VI 期时, 组织切片观察均未发现明显的雄性组织出现, 而在产卵后的间期性腺中可看到初级精母细胞, 预计在从 IV 卵巢到间期的发育过程中, 会有性逆转相关基因表达, 因此本研究选用间期性腺与 IV 期卵巢进行比较分析。另一方面, 卵巢发育到 V 期以后已经成熟, 卵巢腔内几乎充满了体积较大的卵泡, 对后续实验会有一些影响。综上所述, 本研究最终确定利用黄鳍发育 IV 期卵巢和间期性腺进行差异表达基因的分析实验。

另外, 为保证抑制差减杂交顺利进行, 检测消减效率十分必要。本研究通过比较黄鳍 β -actin 在消减和未消减的 PCR 产物中的表达量来分析构建文库的消减效率。结果显示: 在正反向文库中经过消减后的样本需要多 5 个循环才能扩增出明显条带, 表明 β -actin 基因在正反向差减 cDNA 文库中的消减效率高达 2^5 倍。

本研究在成功构建的正、反向文库中获得了多个差异表达的 cDNA 片段, 序列分析表明, 这些基因多数为未报道的新基因, 有些已知功能的基因可能与黄鳍性腺发育和性逆转过程相关。Spiggin 蛋白由 α 、 β 和 γ 3 个亚单位组成, 它的产生受雄激素控制^[12]。有研究报道在雌性棘鱼 (*Pungitius pungitius sinensis*) 体内随着 17α -甲基睾酮和 5α -双氢睾酮浓度的增加有 spiggin 蛋白的产生^[13], 其机制尚未阐明, 推测可能是内源性或外源性雄激素诱导而产生。在反向文库中筛选到的

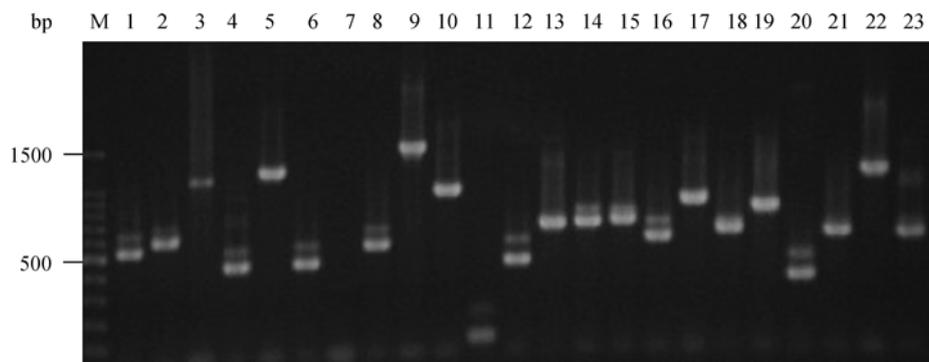


图 4 正反向差减文库 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

M: 100 bp marker; 1-23: PCR 扩增的插入片段结果。

Fig. 4 Agar electrophoresis gel of representative PCR results from bacterium culture
M: 100 bp marker. Lane 1-23: PCR amplification result of insert cDNA products.

表 1 黄鳍性腺抑制差减杂交文库中部分差异表达克隆序列的同源性分析

Tab.1 Sequence homology analysis of the fragments from subtracted cDNA libraries of *Monopterus albus* gonad

编号 identity	同源基因 homologous gene	基因登录号 access. no.	同源序列物种 organism with homology	期望值 E-value
Fs1	ADP-ribosylationfactor-like protein2-binding protein putative mRNA	BT083085.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	8.00E-141
Fs11	testis-expressed sequence 12 protein	BT083083.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	2.00E-70
Fs13	mitochondrial DNA	AP002945.1	<i>Monopterus albus</i>	0
Fs16	clone CNB277-H05 mRNA sequence	BT028670.1	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	1.00E-75
Fs28	hyperosmotic glycine rich protein mRNA,	FJ438505.1	<i>Epinephelus coioides</i>	2.00E-160
Fs67	isolate 2G04 B2-microglobulin mRNA	DQ234795.1	<i>Pseudosciaena crocea</i>	1.00E-34
Fs74	sperm flagellar 2 (spef2), mRNA	NM_001128232.1	<i>Danio rerio</i>	1.00E-34
F84	Calmodulin putative mRNA	BT057213.1	<i>Salmo salar</i>	2.00E-31
F96	S-phase kinase-associated protein 1 putative mRNA	BT083011.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	0
F112	mRNA for fish virus induced TRIM protein	AM887825.1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	6.00E-32
Rs8	sodium potassium ATPase beta subunit mRNA	AY553206.1	<i>Rhabdosargus sarba</i>	7.00E-92
Rs11	mRNA for spiggin type-1C	AB243103.1	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	2.00E-30
Rs18	mRNA for alpha2-macroglobulin	AB300222.1	<i>Lepomis macrochirus</i>	1.00E-51
Rs19	platelet-derived growth factor receptor	U63926.1	<i>Fugu rubripes</i>	2.00E-21
Rs20	FAM136A putative RNA	BT083343.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	7.00E-173
Rs45	CP068 protein (cp068), mRNA	BT044662.1	<i>Salmo salar</i>	4e-20
Rs47	cullin 1a, mRNA	BC066480.1	<i>Danio rerio</i>	7.00E-119
Rs81	Glyoxalase domain-containing protein5 putative mRNA	BT082830.1	<i>Anoplopoma fimbria</i>	5.00E-127
Rs98	zona pellucida protein X mRNA	AY928799.1	<i>Sparus aurata</i>	7.00E-102
Rs105	Succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit	BT049986.1	<i>Salmo salar</i>	3.00E-74
Rs113	DNA primase small subunit (pri1), mRNA	NM_001141876	<i>Salmo salar</i>	0

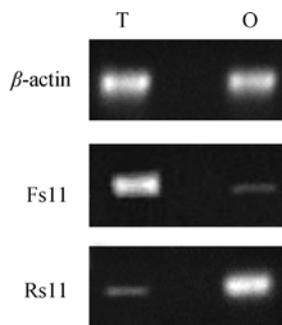


图 5 Fs11 和 Rs11 的半定量 RT-PCR 分析电泳图

T: 间期性腺; O: IV 期卵巢.

Fig. 5 Semi-quantitative RT-PCR analysis of Fs11 and Rs11
T: ovotestis; O: ovary at stage IV.

Zona pellucida protein X (透明带蛋白)是卵母细胞和周围的卵泡细胞之间的一层半透明糖蛋白, 受雌二醇的调控。在大西洋鲑(*Salmo salar* Linnaeus)中, 透明带蛋白在肝脏合成后被转运至性腺组织, 通过特异受体系统进入性腺细胞内发挥作用^[14]。本实验结果显示, 透明带蛋白在黄鳍 IV 期、V 期和 VI 期卵巢发育过程中发挥重要作用。在正向文库中得到的细胞 s 相激酶相关蛋白是泛素-蛋白

酶体途径中的一种 F-box 蛋白^[15], 而泛素-蛋白酶体途径是细胞内泛素化蛋白质的降解途径, 所以推测细胞 s 相激酶相关蛋白可能参与黄鳍卵巢内卵母细胞的降解过程。以上结果也说明本实验的抑制差减文库的建立是成功的。

根据与 spiggin 和 testis-expressed sequence 12 protein 基因同源性较高的 EST 序列设计引物, 针对黄鳍 IV 期卵巢和间期性腺的 cDNA 进行了这 2 个基因的半定量分析, 结果与抑制差减杂交一致。实验结果不仅说明了本研究黄鳍性腺抑制差减文库的成功, 也说明 spiggin 和 testis-expressed sequence 12 protein 基因分别在卵巢和精巢中特异表达, 推测其在黄鳍的性腺发育以及性逆转过程中发挥重要作用。

本研究成功构建了黄鳍间期性腺和 IV 期卵巢抑制差减文库, 对文库中获得的 90 条 EST 进行同源性比对分析后, 初步明确了黄鳍性逆转前后的基因表达情况, 但结果涉及的一些差异基因是否在黄鳍性腺发育和性逆转过程中起作用, 作用

的大小和表达的时空性等还有待进一步地研究。此外,从差减杂交文库中还得到了一些新的基因,因为没有比对到相应同源基因,所以现阶段其本身有没有意义,有待进一步的研究分析。

参考文献:

- [1] 刘建康. 鳊鱼始原雌雄同体现象之研究[J]. 国立中央研究院动植物研究所丛刊, 1944, 15(1-6): 1-8
- [2] 刘建康, 顾国彦. 鳊鱼性逆转时生殖腺组织的改变[J]. 中国水生生物学报, 1951, 2(1-2): 85-109
- [3] 肖亚梅. 黄鳊繁殖生物学研究: 黄鳊的雌性发育[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 1995, 18(4): 45-51.
- [4] 肖亚梅, 刘筠. 黄鳊由间性发育转变为雄性发育的细胞生物学研究[J]. 水产学报, 1995, 19: 297-301.
- [5] 陈丽莉, 肖亚梅, 刘筠. 黄鳊一种新的生殖腺发育状况报道[J]. 水生生物学报, 2006, 30: 621-624.
- [6] 吕道远, 宋平, 陈云贵. 黄鳊性腺自然逆转过程中 vasa 基因的表达分析[J]. 动物学报, 2005, 51(3): 469-475.
- [7] 彭茂宇, 宋平, 桂建芳. 黄鳊 DEAD-box 家族 PL10 基因的克隆与序列分析[J]. 武汉大学学报: 理学版, 2005, 51(2): 227-234.
- [8] Sinclair A H, Berta P, Palmer M S, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. Nature, 1990, 346: 240-244.
- [9] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female transgenic SRY [J]. Nature, 1991, 351: 117-121.
- [10] 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.
- [11] 杨霞, 孙建义, 钱利纯, 等. 抑制消减杂交 SSH 技术的研究与应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 2: 24-26.
- [12] Jones I, Lindberg C, Jakobsson S, et al. Molecular cloning and characterization of spiggin. An androgen-regulated extraorganismal adhesive with structural similarities to von Willebrand factor-related proteins [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 17857-17863.
- [13] Katsiadaki I, Scott A P, Mayer I. Potential of the stickleback as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters [J]. Mar Environ Res, 2002, 54: 725-728.
- [14] Wasserman P M. Zona pellucida glycoproteins [J]. J Biol Chem, 2008, 283(36): 24285-24289.
- [15] Li W W, Fan J, Hochhauser D, et al. Lack of functional retinoblastoma protein mediates increased resistance to antimetabolites in human sarcoma cell lines [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 10436-10440.

Construction and analysis of gonad suppression subtractive hybridization library of rice field eel (*Monopterus albus*)

QU Xiancheng¹, SHANG Xiaoli¹, CHENG Cui¹, QU Xuewei², ZHANG Yong¹, ZHANG Kaiyue¹, JIANG Jiaoyun¹

1. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
2. Muping District Yantai Fisheries Technical Service Center, Yantai 264100, China

Abstract: By using suppression subtractive hybridization (SSH), subtracted cDNA libraries were constructed from rice field eel (*Monopterus albus*) gonad at IV ovary and ovotestis stage. Two-directional (forward and backward) SSH was performed under cDNAs of rice field eel gonad at IV ovary and ovotestis stage. The cDNA fragments were inserted into plasmid vectors, and then transformed into *Escherichia coli* DH5 α . Finally, forward and backward subtracted cDNA libraries (461 and 674 clones, respectively) were obtained. By PCR detection, length of the subtractive cDNA fragments cloned into the vector ranged from 200 bp to 2 000 bp. One hundred positive clones were selected and sequenced randomly from the forward and the backward libraries, and ninety gene fragment sequences were obtained. EST analysis of these sequences was performed with Blastx and Blaxtn by comparing sequences with GenBank database. Two sequenced genes were further analyzed by semi-quantitative RT-PCR method. The results showed that the library can enrich differentially expressed genes in the two phases gonad. [Journal of Fishery Sciences of China, 2011, 18(1): 23-28]

Key words: *Monopterus albus*; gonad; suppression subtractive hybridization; subtractive cDNA library