

文章编号: 1000-0615(2004)03-0323-06

• 综述 •

抑制消减杂交(SSH)及其在鱼类基因克隆中的应用

程起群

(中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

关键词: 抑制消减杂交; 鱼类; 基因克隆; 差异表达基因

中图分类号: Q785; S917 文献标识码: A

Suppression subtractive hybridization and its application to fish gene cloning

CHENG Qi-qun

(Key and Open Laboratory of Marine and Estuary Fisheries, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090)

Abstract: There are 10 percent to 15 percent genes expression in certain cells during the life time of fishes like other vertebrates. The genes were different at different development stage, under different physiological conditions, and in different kinds of cells. So comparing the differences of gene expression in different cells can help us understand the genetic nature of phenotypic differences, and understand the basic information of life period, and find the genes in relation to development and diseases, and finally benefit mankind. Several methods were developed to clone differential expression gene in recent years. They are subtractive hybridization (SH), differential display (DD), representational difference analysis (RDA), and so on. These methods all have positive influences on cloning special genes, but they all have some defects, such as higher false positive, lower replication, lower sensitive and difficulty to manipulate. Suppression subtractive hybridization (SSH) was developed by Diatchenko et al in 1996. SSH was based on suppression PCR and combines normalization and subtraction in a single procedure. It is a more effective and convenient method than all others mentioned above. The principle and the rules of manipulation of SSH in detail was illuminated and the novel genes cloned by SSH was listed. They are immune related genes and reproduction and development related genes. The reproduction and development related genes are as follows: ZP3, Cyclin A2, CB102, YA2, FSTRAP. The immune related genes are as follows: NKEF (natural killer enhancing factor), CC chemokine, CXCR1, CXCR2, CXCR4, AIF-1 (allograft inflammatory factor 1), IL-1 β (interleukin 1), Fc ϵ RIV (γ submit of high affinity Fc receptor for IgE), SSA (serum amyloid A), LECT2 (leucocyte cell derived hemotaxin 2), GMF β (glia maturation factor β), CD45, Lysozyme C, PBEF (Pre-B cell enhancing factor), C-type lectin, PTX (Pentraxin), IL-1RIL, IL-8 like CXC chemokine, TF (tissue factor), trout chemokine 2, TNF decoy receptor, M17. Some subtracted cDNA libraries were also built by SSH method.

Key words: suppression subtractive hybridization; fish; gene clone; differential expression gene

收稿日期: 2003-05-09

资助项目: 中国水产科学研究院重点科研计划青年基金项目(2003-青-4); 农业部水产增养殖生态生理重点开放实验室开放课题

作者简介: 程起群(1972-), 男, 安徽东至人, 在读博士研究生, 助理研究员, 主要从事种质资源和分子遗传学研究。Tel: 021-

65686991, E-mail: ciqucheng@yahoo.com.cn

和其它脊椎动物一样,在鱼类的生命进程中,某种特定类型的细胞中只有比例约为 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,比较两种不同类型细胞中基因表达的差异,可以探究表型的遗传原因,了解生命过程的基本信息,从而找到与发育、疾病等相关的基因。

90 年代兴起的人类基因组计划(GHP),积极推动了基因克隆技术的发展,相继出现了数种基于消减杂交策略的基因克隆方法。这些方法不需知道已知基因的位置和功能,直接在基因组的 DNA 和 RNA 水平获得有意义的目的基因片段。主要有消减杂交法(Subtractive Hybridization, SH)、mRNA 差异显示(Differential Display, DD)、代表性差异显示(Representational Difference Analysis, RDA)、抑制消减杂交法(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)等等。

1 差异表达基因筛选方法回顾

1.1 消减杂交法

1984 年, Lamar 等^[1]报道消减杂交法(Subtractive Hybridization, SH)克隆 Y 染色体特异性探针; Kunkel 等^[2]将这种方法用于杜兴氏肌营养不良(DMD)基因的定位克隆。这是早期建立的经典方法。该法通过构建富含目的基因序列的 cDNA 文库进行基因分离,其本质是将共同拥有的序列消减掉,以富集目的基因序列,提高分离的敏感性。该法对高丰度的 mRNA 而言是有效的,尤其适于分离由于缺失而造成的遗传病的相关基因;但很难获得低丰度的差异基因,且存在重复性差、敏感性低的缺点。

1.2 mRNA 差异显示

1992 年, Liang P 等^[3]上报了差异显示法(Differential Display, DD)。此项技术通过比较不同细胞类型或在不同状态下的同种细胞类型扩增的 cDNA 产物的电泳谱带,找出差异条带,来鉴定差异表达基因。该法具有操作简便,技术成熟,敏感性高,重复性好,快速等优点,能同时比较两种以上不同来源的 mRNA 样品之间的基因表达差异。但是该法存在假阳性率高,甚至达 70%^[4, 5], 获取差异片段短小,难以获得稀少转录的低丰度差异基因,而且反转录获得的 cDNA 多为 mRNA 的 3' 非翻译区,要获得 mRNA 翻译区需要进行费时的 cDNA 文库筛选过程等等缺点,因此其应用也有局限性。

1.3 代表性差别分析法

1993 年, Lisitsyn 等^[6]建立了代表性差别分析法(Representational Difference Analysis, RDA)。该方法以消减和富集为基础,其目的在于减少假阳性,增加重复性。该方法不需对单链和双链的 cDNA 进行物理性分离,充分发挥了 PCR 指数扩增双链模板和线性扩增单链模板的特性,经过代表性筛选和差异性富集大大提高了消减杂交的效率,

其目的基因片段得到特异性扩增。其 mRNA 用量少,特异性高。实验操作时,一般要进行几轮循环。第一轮 RDA 主要起消减作用,后几轮 RDA 则起富集作用。该法操作步骤比较烦琐;低丰度分子被扩增的几率仍很低;酶切连接步骤多, cDNA 会损失很多,可能漏掉关键基因;而且,如果两组 cDNA 之间存在较大差异,以及某些基因在检测子(tester)中存在上调表达时,此方法也难于分析。

1996 年, Diatchenko 等^[7]建立了一种新的 cDNA 消减杂交方法称为抑制消减杂交法(suppression subtractive hybridization, SSH),它克服了 DD 法的假阳性较高和 RDA 法消减杂交轮次较多的缺点,十分适用于克隆分析造成某种特殊表型的目的基因及其功能,从而成为差异表达基因筛选的最有潜力的新方法。

2 抑制消减杂交

2.1 抑制消减杂交的基本原理

抑制消减杂交法报道于 1996 年 6 月^[7]。该法是以抑制 PCR 为基础,将检测子 cDNA 标准化与消减杂交相结合所形成的。抑制 PCR,是利用非目标序列片段的长反向重复序列在退火时产生“锅柄”结构,无法与引物配对,从而选择性抑制非目标序列的扩增。标准化(normalization)步骤平衡了目的基因群中 cDNA 的丰度,即低丰度的差异表达基因不会丢失,而高丰度差异表达的基因又不会被过量分离。消减杂交则是扣除检测子(tester)和驱动器(driver)之间的共有序列,使不同的序列得以扩增。

2.2 抑制消减杂交的具体步骤

以睾丸特异表达基因的克隆为例,说明抑制消减杂交法的具体操作过程(图 1)。

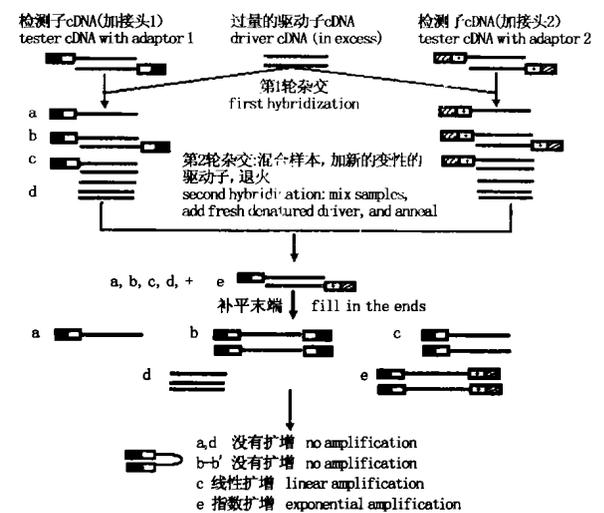


图 1 抑制消减杂交示意图(参考文献[7])

Fig. 1 Scheme of the SSH method(Based on reference[7])

(1) 设计寡核苷酸的序列。包括 cDNA 合成引物

(Pr16), 接头1(adaptor1)和接头2(adaptor2), 以及PCR扩增引物(P1, P2, PN1, PN2)。其中接头是由一个长链(约40nt)和一个短链(约10nt)组成的一端是平端的双链DNA片段。双链两个5'端均无磷酸基团, 使得接头以唯一的方向与cDNA片段连接; 接头的长链外侧序列与第一次PCR引物序列相同, 内侧序列与第二次PCR引物序列相同; 接头上含有T7启动子序列并含有限制性内切酶识别位点, 为该片段插入克隆载体提供酶切位点。

(2) 驱动子准备(driver preparation)。以2 μ g人poly(A)⁺为模板, 以1ng的Pr16为引物, 合成驱动子双链cDNA(按试剂盒说明进行)。相应的cDNA沉淀溶解于10 μ L的去离子水中, 在50 μ L的反应体系中, 用限制性内切酶RsaI或HaeIII酶切3h, 以产生大小适当的平头末端的cDNA片段。将cDNA经酚抽提、乙醇沉淀后, 重溶于7 μ L去离子水中; 驱动子的终浓度约300ng \cdot μ L⁻¹。

(3) 检测子准备(Tester Preparation)。限制性内切酶RsaI或HaeIII酶切之前的步骤与驱动子一样。将消化的检测子cDNA(1 μ L)溶解于5 μ L的水中; 在不同的连接反应体系中(总体积均10 μ L), 将溶解的cDNA(2 μ L)分别连上接头1(adaptor1)和接头2(adaptor2)(10⁻⁴mol \cdot L⁻¹)。

(4) 两轮消减杂交。将过量的driver cDNA(600ng)分别加入两份连有接头的tester cDNA(20ng)的反应管中。98 $^{\circ}$ C变性1.5min后, 于68 $^{\circ}$ C退火杂交10h。第一次杂交后有4种产物: a是单链tester cDNA; b是自身退火的tester cDNA双链, c是tester和driver的异源双链, d是单链driver cDNA。第一次杂交是使tester单链cDNA标准化, 也就是使原来有丰度差别的单链cDNA的相对含量达到基本一致。这种标准化的实现是依据杂交的二级动力学原理, 即丰度高的单链cDNA在退火时产生同源杂交的速度要快于丰度低的单链cDNA。同时, 由于tester cDNA中和driver cDNA序列相似的片段大都和driver形成异源双链分子c, 使tester DNA中的差异表达基因的目标cDNA得到大量富集。

第一次杂交后, 合并两份杂交产物, 另加上新的变性driver单链150ng, 再次退火杂交(68 $^{\circ}$ C, 10h)。这时, 只有第一次杂交后经标准化和消减的单链tester cDNA能与driver cDNA一起形成各种双链分子。这次杂交进一步富集了差异表达基因的cDNA, 并且产生了一种新的双链分子e, 它的两个5'端有两个不同的接头。

(5) 两次PCR反应。杂交后, 填平粘性末端, 进行扩增。先用外侧那对引物进行PCR反应。反应体系25 μ L, 包含1 μ L溶解的、消减的cDNA, 1 μ L PCR引物P1(5 μ mol \cdot L⁻¹), 1 μ L PCR引物P2(5 μ mol \cdot L⁻¹)。PCR条件为: 75 $^{\circ}$ C, 7min; 30 \times (91 $^{\circ}$ C, 30s; 68 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 2.5min); 68 $^{\circ}$ C, 7min。e型分子两端都能和引物配对, 指数扩增, 而c型的双链分子只在一端有一个引物配对, 线性扩增, 效率比e型分子低得多, b型分子由于两端有长序列的反向重复, 可互补形成

牢固的“锅-柄”二级结构, 不能进行有效扩增。a、d片段由于没有引物结合位点, 不能进行PCR扩增。

扩增后, 以1 μ L的产物为模板, 和第1次条件相同的情况下, 进行第2次扩增, 第2次PCR是用内侧那对引物进行扩增, 扩增循环数为10, 引物改为PN1和PN2。通过第2次巢式PCR扩增, 极大地提高扩增的特异性, 使在最后的PCR产物中绝大部分是e型分子, 使得差异表达的目的基因片段得到大量富集。

这样, 使得driver cDNA与tester cDNA的共有序列得到抑制, 而在driver cDNA中缺乏, tester cDNA中存在的差异序列得到了显著的扩增, 进一步酶切、转化、筛选, 就可以得到差异表达基因。

2.3 抑制消减杂交法的优点

SSH技术, 综合了DD和RDA两种技术的特点, 因此具备了两项技术各自的优点且相应地改进了各自的缺点。

(1) 提高了特异性, 降低了假阳性率。这是SSH的最大优点。据Stein等报道^[8], 他们用转移性和非转移性的两种胰腺肿瘤细胞Bsp73 ASML和Bsp73 IAS作比较, 有力地证明了SSH方法的真阳性率高达94%。

(2) SSH方法具有高度敏感性的特点。在DD和RDA中, 低丰度的mRNA一般不易被检出。SSH方法则不同, 它的均等化和目标片段的富集, 使得一次消减杂交可以富集稀有序列1000倍以上^[7], 保证了低丰度mRNA也有被检测的可能。

(3) 提高了基因克隆的效率, 由于使用四碱基内切酶使得基因(组)的复杂程度降低, 大大地提高了信息量, 更具代表性。

(4) 速度快, 效率高。Stein^[8]等的研究表明, 一次SSH反应中, 可同时分离出成百个差异表达的基因, 这一优点也使得SSH方法远胜于DD或RDA。

(5) 程序相对简单, 操作简便, 仅需两轮杂交, 不需移出杂交复合体, 接头设计简化, 不需反复交换接头, 不必移出(或降解)接头。

2.4 抑制消减杂交法的不足

尽管SSH有上面所提及的各种优点, 但仍不可避免地存在一些不足。

(1) 该方法要几微克量的mRNA, 若是mRNA量不够, 那么低丰度的差异表达基因的cDNA很可能检测不到。这个对mRNA量的要求可能是普遍推广使用的一个障碍。

(2) 消减库中的cDNA因为已被限制酶消化, 不再是全长cDNA。但现在已有很多方法可从部分cDNA出发获得全长cDNA, 如RACE技术。

(3) 对材料要求较高, 材料的背景差异不能太大。

3 抑制消减杂交在鱼类基因克隆中的应用

自1996年Diatchenko等^[7]首次报道SSH方法, 并克隆分析了睾丸和卵巢差异表达基因以来, SSH技术得到广泛

的应用,在鱼类基因克隆上也有较多的报道,一批新的差异表达基因相继得到克隆。主要表现在鱼类生殖和发育相关基因的克隆和免疫调控相关基因的克隆。

3.1 生殖和发育相关基因的克隆

胚胎的不同发育阶段,分化产生不同的组织和器官,显然这其中有不同的基因表达,因此发育过程中调控基因的分离与鉴定是发育分子生物学的重要研究内容。

SSH 克隆到的发育相关基因,目前都是以雌核发育银鲫和两性生殖彩鲫为材料获得的。银鲫是一种雌核发育生殖鱼类,它通过抑制第一次减数分裂(不排出第一极体)而保持染色体的完整。这种卵母细胞成熟期间的纺锤体行为与雌雄异体的鱼类是显著不同的。由于其遗传背景和繁殖模式独特,从而是了解卵母细胞成熟分裂调控机制的理想模式系统。表 1 列出了应用 SSH 克隆到的新基因。

表 1 SSH 技术克隆的生殖和发育相关新基因

Tab. 1 Novel genes correlated with reproduce and development cloned by using of SSH

鱼类 fish	检测子 tester	驱动子 driver	基因 gene	时间 time	文献 references
雌核发育银鲫和 两性生殖彩鲫 gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp	银鲫卵母细胞(彩鲫卵母细胞) oocytes of gynor carp (or gonor carp)	彩鲫卵母细胞(银鲫卵母细胞) oocytes of gonor carp (or gynor carp)	ZP3	2001	[9]
	彩鲫卵母细胞 oocytes of gonor carp	银鲫卵母细胞 oocytes of gynor carp	Cyclin A2	2003	[10]
	银鲫卵母细胞 oocytes of gynor carp	彩鲫卵母细胞 oocytes of gonor carp	CB102	2001	[11]
雌核发育银鲫 gynogenetic silver crucian carp	银鲫卵母细胞 oocytes of gynor carp	彩鲫卵母细胞 oocytes of gonor carp	YA2	2001	[11]
	银鲫卵母细胞(V 期) oocytes of gynor carp (phase V)	银鲫卵母细胞(I 期) oocytes of gonor carp (phase I)	FSTRAP	2001	[12]

另外,Shi 等^[13]应用 SSH 技术构建了银鲫尾芽期(tail bud stage, TBS)和心跳起始期(heartbeat beginning stage, HBS)特异性的质粒文库,筛选了两个阶段之间的特异性表达基因。与 NCBI 数据库比较表明,169 个 TBS 点杂交的阳性克隆中有 129 个没有同源序列,有可能是未知的新基因;而 HBS 点杂交的阳性克隆主要是已知的基因。这为研究雌核鱼类胚胎发育基因表达的时空调控机制打下基础。马长艳等^[14]应用抑制消减杂交技术构建了中华绒螯蟹 II 期和 III 期卵巢的特异性消减 cDNA 文库,为克隆河蟹卵巢发育相关新基因,探讨河蟹卵巢发育的分子机理奠定基础。

3.2 免疫调控相关基因

每个健全的个体都在通过多种防卫机制抵御外来病原体的侵犯以保护自己。这些机制主要有物理屏障、细胞吞噬和杀伤、补体系统,以及血液内多种因子的作用。对免疫系统的研究表明,作为低等脊椎动物的鱼类,具有先天性和获得性的免疫原性,同源于哺乳动物的免疫系统。免疫系统在鱼类抵抗疾病,适应外界环境等方面有重要的作用。因此克隆编码免疫系统的基因,是研究鱼类基因工程疫苗,提高鱼类适应能力,抵抗疾病,从而增高存活率的一个重要步骤。应用 SSH 克隆的免疫调控基因,是以鲤鱼和虹鳟为材料获得的,有关新基因见表 2。

另外,Bayne 等^[24]以注射一种在福氏不完全佐剂中乳化的弧菌疫苗的虹鳟的肝的 cDNA 为检测子(Tester),未处理的肝为驱动子(Driver),进行抑制消减杂交。构建的

cDNA 文库中,包含有很多 300 至 600bp 的免疫相关基因片段。其中,15 个是鲑科中未报道的,12 个是所有鱼类中未知的。

张义兵等^[25]以紫外线灭活的 GCHV(草鱼出血病病毒)诱导过的细胞为检测子(Tester),以未经病毒诱导的细胞为驱动子(Driver),构建鱼类细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库,并从文库中分离鉴定出 Stat1、Jak1、Mx、Viperin、IRF 和 TLR3 等抗病毒或免疫相关基因在内的 69 个基因,其中 46 个为已知基因同源物,28 个基因在鱼类中为首次报道^[26],对认识鱼类细胞抗病毒免疫的分子机制有重要意义。

3.3 展望

SSH 技术在鱼类基因克隆中的应用,取得了很多的成果,克隆了一系列的新基因,为深入研究鱼类发育的时空表达特征和免疫调节机理打下良好的基础,但成果有限。因为在世界范围内,仅有几个研究小组对为数不多的材料进行研究,研究的领域也仅局限于发育和免疫,这对于全面揭示鱼类的生理过程和生命特征是远远不够的。随着越来越多的研究者参与,有关代谢过程的调控基因、有关疾病相关基因、以及有关病原微生物的毒性基因的研究也会得到开展。

科学技术的飞速发展,使得 SSH 与一些新技术结合并进行大规模差异基因筛选成为可能,如基因芯片技术。目前有人将 SSH 与 Microarray 结合用于差异基因的大规模筛选^[27]。

表 2 SSH技术克隆的免疫调控相关新基因

Tab. 2 Novel genes correlated with immune system cloned by using of SSH

鱼类 fish	基因 gene	检测子 tester	驱动子 driver	时间 time	文献 references
	自然杀伤细胞增强因子 NKEF natural killer enhancing factor	海藻酸钠注射的腹膜细胞 peritoneal cells injected with sodium alginate	未处理的头肾细胞 nontreated head kidney cells	1999	[15]
	CC 趋化因子 CC chemokine				
	CXC 趋化因子受体 CXCR1, CXCR2, CXCR4				
	异源移植炎症因子 1 AIF-1, allograft inflammatory factor-1				
	白细胞介素- β IL- β , interleukin β	海藻酸钠和硬葡聚糖注射 的头肾细胞和腹膜细胞的混合物 mixture of head kidney cell and peritoneal cells injected with both sodium alginate and scleroglucan	未处理的头肾细胞 nontreated head kidney cells	2000	[16]
鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	IgE 高亲和力 Fc 受体 γ 亚单位 Fc ϵ RI γ , γ subunit of high affinity Fc receptor for IgE				
	血清淀粉样蛋白 A SAA, serum amyloid A				
	白细胞衍生化学吸引素 2 LECT2, leucocyte cell derived chemotaxin2				[17]
	神经胶质成熟因子 β GMF β , glia maturation factor β				
	CD45				
	溶菌酶 C Lysozyme C				
	PBEF Pre B cell enhancing factor				[18]
	G 型外源凝集素 C-type lectin	注射松脂油的腹膜细胞 peritoneal cells injected with turpentine oil	未处理的头肾细胞 nontreated head kidney cells	2001	[19]
	Pentraxin (PTX)				
	M17	海藻酸钠注射的腹膜细胞 peritoneal cells injected with sodium alginate	未处理的头肾细胞 nontreated head kidney cells	2003	[20]
		LPS 和 TNF α 处理的头肾白细胞 head kidney leukocyte stimulated by treatment with LPS plus TNF α	未处理的头肾白细胞 nontreated head kidney leukocyte	2000	[21]
	II 型白细胞介素 1 受体 IL-1RII				
	白细胞介素 8 样 CXC 趋化因子 IL-8 like CXC chemokine			2002	[22]
虹鳟 Rainbow trout	组织因子 TF tissue factor				
	虹鳟趋化因子 2 trout chemokine 2	PHA 活化的造血细胞 PHA activated haematopoietic cells	未活化的造血细胞 nontreated haematopoietic cells		[23]
	肿瘤坏死因子诱导受体 TNF decoy receptor				

随着人类基因组计划和鱼类基因组测序的完成, SSH 筛选到的特异片段序列, 可与相应的基因序列库中 EST 进行同源比较或通过计算机分析查找到基因的全序列, 进而推测、鉴定蛋白的功能, 为包括环境基因组、药物基因组等在内的功能基因组研究提供了新手段, 进一步把基因克隆

的研究推向基因功能的研究。

综上所述, SSH 方法是一种高效便捷的鉴别差异表达基因的新方法。该方法的出现和应用已日益受到人们的重视并将会在解码生命, 造福人类的探索中发挥积极的作用。

参考文献:

- [1] Lamar E E, Palmer E Y. Encoded, species specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains[J]. Cell, 1984, 37: 171- 177.
- [2] Kunkel L M, Monaco A P, Middlesworth W, et al. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X-chromosome deletion[J]. Proc Natl Acad Sci, 1985, 82: 4778.
- [3] Liang P, Pardee A B. Different display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. Science, 1992, 257 (14): 967- 971.
- [4] Sompayac L, Jane S, Burn T C, et al. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4738- 4739.
- [5] Bertoli D J, Schichter U H, Adams M J, et al. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNA[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (21): 4520- 4523.
- [6] Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes[J]. Science, 1993, 259 (5097): 946- 951.
- [7] Diatchenko L, Lau Y F 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.
- [8] Stein O D, Thies W G, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25 (13): 2598- 2602.
- [9] Fan L C, Yang S T, Gui J F. Differential screening and characterization analysis of the egg envelope glycoprotein ZP3 cDNAs between gynogenetic and gonochoristic crucian carp [J]. Cell Research, 2001, 11 (1): 17- 27.
- [10] Xie J, Wen J J, Yang Z A, et al. Cyclin A2 Is differentially expressed during oocyte maturation between gynogenetic silver crucian carp and gonochoristic color crucian carp[J]. J Exp Zool, 2003, 295A (1): 1- 16.
- [11] Xie J, Wen J J, Chen B, et al. Differential gene expression in fully grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps[J]. Gene, 2001, 271: 109- 116.
- [12] Wen J J, Xie J, Liu S G, et al. Differential expression and characterization analysis of a new gene with WD domains in fish oogenesis[J]. Science in China, 2001, 44: 541- 553.
- [13] Shi Y H, Liu J, Xia J H, et al. Screen for stage specific expression genes between tail bud stage and heartbeat beginning stage in embryogenesis of gynogenetic silver crucian carp[J]. Cell Research, 2002, 12 (2): 133- 142.
- [14] Ma C Y, Zhou K Y, Guo Y J, et al. Construction on subtractive cDNA library of Mitten Hand Crab Ovaries [J]. Zoological Research, 2003, 24 (1): 53- 56. [马长艳, 周开亚, 郭豫杰, 等. 中华绒螯蟹卵巢差减 cDNA 文库的构建[J]. 动物学研究, 2003, 24(1): 53- 56.]
- [15] Fujiki K, Shin 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.
- [16] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin 1 beta, high affinity immunoglobulin E Fc receptor gamma subunit and serum amyloid A[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (3): 229 - 242.
- [17] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) leucocyte cell-derived chemotaxin 2, glia maturation factor beta, CD45 and lysozyme C by use of suppression subtractive hybridization [J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (7): 643- 650.
- [18] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning and expression analysis of the putative carp (*Cyprinus carpio*) pre B cell enhancing factor[J]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10 (4): 383 - 385.
- [19] Fujiki K, Bayne C J, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) G type lectin and pentraxin by use of suppression subtractive hybridization [J]. Fish Shellfish Immunol, 2001, 11 (3): 275- 9.
- [20] 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]. Developmental and Comparative Immunology, 2003, 27: 127- 136.
- [21] Sangrador V A, Samuel A M M, Paul G O Dea, et al. Cloning and characterization of the Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) type II interleukin 1 receptor cDNA [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 7031- 7037.
- [22] Sangrador V A, Lemington 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, 17 (2): 66- 70.
- [23] 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 fragments containing AU-rich element[J]. Cytokine, 2002, 17 (2): 71- 81.
- [24] 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 of suppression subtractive hybridization[J]. Developmental and Comparative Immunology, 2001, 25: 205- 217.
- [25] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells[J]. Acta Hydrobiol Sin, 2003, 27 (2): 113- 118. [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.]
- [26] Zhang Y B, Zhang Q Y, Xu D Q, et al. Identification of antiviral relevant genes in the cultured fish cells induced by UV-inactivated virus[J]. Chinese Science Bulletin, 2003, 48 (5): 457 - 463. [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.]
- [27] Bangur C S, Switzer A, Fan L Q, et al. Identification of genes over expressed in small cell lung carcinoma using suppression subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis [J]. Oncogene, 2002, 21: 3814- 3825.