

银鲫原肠胚差异表达基因的筛选

刘静霞 石耀华 桂建芳

(中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室;中国科学院研究生院,武汉 430072)

摘要:胚胎发育是基因组中各个基因在时间和空间上选择性表达的结果。为了鉴定参与鱼类早期胚胎发育和胚层分化的调控因子,分别构建了银鲫(*Carassius auratus gibelio*)原肠胚和成熟卵子的 SMART cDNA 文库,并采用差异筛选的方法,从银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库中筛选不同于成熟卵子的差异表达基因。通过菌斑和 PCR 产物的两轮斑点杂交,从大约 1500 个克隆中筛选出 131 个阳性克隆,从中选择 58 个克隆测序并将测得的序列进行了数据库比对分析,结果显示这些差异表达基因大部分为参与转录和翻译的调控因子和核糖体蛋白以及一些在胚胎早期大量表达的参与脂类代谢的脂蛋白和一些未知的新基因。接着采用 RT-PCR 技术,对其中 6 个基因在胚胎发育不同阶段的表达特征进行了分析,进一步证实这些基因在胚胎发育过程中存在表达差异;研究还从分析的基因中揭示出 4 类不同的表达模式。通过本研究,已筛选出一批在银鲫胚胎发育早期开始表达的调控基因,为开展鱼类胚胎发育早期表达基因的功能研究奠定了前期工作基础。

关键词: 银鲫;原肠胚;胚胎发育;SMART cDNA 文库;差异表达

中图分类号: Q173 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)04-0359-07

原肠胚期是胚胎发生中一个极为重要的时期,在这个时期,囊胚细胞通过运动而发生细胞重排,使胚体细胞被重新定位,初步形成内、中、外三个胚层,构成所有器官形成的细胞基础。在原肠胚期,细胞核控制细胞分化的作用日益明显,胚胎细胞开始合成新的各种类型的 RNA 和专一性的蛋白质,指导器官原基的形成和细胞的分化及定位^[1]。已有的研究表明,在果蝇的早期发育中,有 60 个基因参与了从模式形成到体节出现这一胚胎发育过程,同时估计脊椎动物的参与基因更多^[1]。

鱼类以其产卵量大、胚胎体外发育、胚体透明和发育速度快等特点,近年来已成为发育生物学研究的主要对象^[2-4]。迄今为止,利用同源克隆或正向遗传学的方法在鱼类中鉴定到大量的参与早期胚胎发育的因子。例如参与内胚层分化的 Nodal 通路的信号因子, *Znr-1* 和 *Znr* 的克隆是利用老鼠和爪蟾的序列设计简并引物从库中扩增而获得^[5];参与鱼类早期胚胎发育和胚层分化的重要调控因子如 *Squint*, *Cyclops*, *Cas*, *Boz* 和 *Oep* 等基因,都是利用定

位克隆的方法,从斑马鱼的突变体中鉴定出来的^[6-11]。银鲫因其天然群体中存在 5%至 20%的雄性个体^[12],且已发现其卵子具有雌核生殖和两性生殖两种不同的生殖方式,已被认为是研究鱼类卵子成熟、受精和早期胚胎发育的独特对象^[13-17]。本研究在实验室构建了银鲫尾芽期胚胎与心跳期胚胎、原肠期胚胎与尾芽期胚胎抑制性差减杂交 cDNA 文库,筛选到一批在这些胚胎发育时期差异表达基因的基础上^[18-22],进一步以银鲫为材料,利用差异呈现方法^[23]试图筛选原肠期胚胎相对于其成熟卵子差异表达的基因,希望获得一些重要的在胚胎发育早期起调控作用的基因。

1 材料和方法

1.1 银鲫及其胚胎 银鲫(*Carassius auratus gibelio* Bloch)取自中国科学院水生生物研究所关桥实验基地,实验鱼的人工催产、受精和胚胎发育按照以前报道的方法进行^[24]。

1.2 胚胎发育各期胚胎总 RNA 的提取 不同发育

收稿日期:2004-09-09;修订日期:2004-10-25

基金项目:国家重点研究发展计划(2004CB117401)、中国科学院知识创新方向项目(KSCX2-SW-303)和中国科学院知识创新领域前沿项目(220309)

作者简介:刘静霞(1976—),女,湖北汉川市人;博士研究生。研究方向:发育遗传学

通讯作者:桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

时期胚胎的总 RNA 用 SV Total RNA Isolation System (Promega) 提取,用于 RT-PCR 检测,步骤详见 SV Total RNA Isolation System(Promega) 操作手册。依试剂盒的说明分别称取适量的新鲜组织,加入 1mL 抽提缓冲溶液。充分匀浆后,各取 175 μ L 匀浆液转移到 1.5mL 离心管中,加入 350 μ L SV RNA 稀释 Buffer,混匀后 70 $^{\circ}$ C 封阻 3min,14000r/min 离心 10min。转移上清,加入 200 μ L 95%乙醇,吹打混匀后转移至离心柱,14 000r/min 离心 1min,加入 600 μ L SV RNA 洗涤液,14 000r/min 离心 1min。加入 50 μ L DNase I 于 20—25 $^{\circ}$ C 消化 15min 后,加 200 μ L SV DNase 终止溶液,14 000r/min 离心 1min。加入 600 μ L SV RNA 洗涤液,14 000r/min 离心 1min 后,再次加入 250 μ L SV RNA 洗涤液,高速离心 2min。用 250 μ L 无 RNA 酶水洗脱总 RNA 两次。总 RNA 于 -70 $^{\circ}$ C 冰冻,真空冻干机超低温冻干浓缩后,溶解于 20—30 μ L 水中,取 0.5 μ L 电泳检测 RNA 浓度和质量。

1.3 SMART cDNA 的合成 SMART cDNA 的合成和文库构建流程参照以前的报道^[25-28]。取以上提取的银鲫成熟卵母细胞和原肠期胚胎的 RNA,按 Clontech SMART PCR Synthesis 试剂盒合成 SMART cDNA。取适量原肠期胚胎的 SMART cDNA 连入 TOPO-XL PCR 载体,并利用电转化的方法将连接产物转入 TOPO10 电转化感受态细胞,在 X-gal/ IPTG 琼脂平板上挑取白色菌落,从而获得银鲫原肠期 SMART cDNA 质粒文库。

1.4 斑点杂交筛选差异表达基因 利用 DNA 地高辛标记试剂盒标记银鲫原肠期胚胎和成熟卵母细胞的第一链 cDNA,分别作为阳性探针和阴性探针。杂交筛选的方法和过程参照以前的报道^[24-27]。第一轮筛选是直接将银鲫原肠期 SMART cDNA 质粒文库的单克隆菌液分别点在两张尼龙膜的对应位置上。膜在 10% SDS 中浸润 3min,再在变性液中浸泡 5min,然后在中和液中浸泡 5min,最后在 2 $\times$ SSPE 中浸泡 3min 后,自然晾干。80 $^{\circ}$ C 烤膜 2h 后即可用于斑点杂交或存放起来。杂交过程与以前的报道相同^[18-21],68 $^{\circ}$ C 预杂交 1.5h,加入探针后 68 $^{\circ}$ C 继续杂交 16h。杂交后于室温洗膜两次,每次 10min,洗膜液为含 0.1% SDS 的 2 $\times$ SSC。再用含 0.1% SDS 的 0.1 $\times$ SSC 于 68 $^{\circ}$ C 洗膜两次,每次 15min,用碱性磷酸偶联的地高辛抗体和 BCIP/NBT 底物进行显色检测。挑选的阳性克隆作为模板用 Nested 引物进行 PCR 扩增,点膜后再用以上探针进行第二轮斑点杂交。

1.5 RT-PCR 分析基因在不同胚胎发育时期的表达

将 SV Total RNA Isolation System(Promega) 提取的总 RNA 用 SuperScript 逆转录酶(GIBCO)和 oligo(dT)引物合成单链 cDNA。用基因特异的引物进行胚胎发育时序的半定量 RT-PCR 检测,以银鲫的 α -tubulin 基因调整模板浓度并作为对照。

2 结果

2.1 原肠胚和成熟卵子 SMART cDNA 的合成以及原肠胚 SMART cDNA 文库的构建

在 SMART cDNA 合成中,只有当逆转录进行到 mRNA 末端时才会发生模板链的转换,其 cDNA 才能被 PCR 扩增。因此,SMART cDNA 合成技术是获取基因全长 cDNA 的较好方法。取 SV Total RNA Isolation System 提取的总 RNA,按 SMART cDNA 文库合成的方法逆转录合成第一链,然后进行 13 个循环的长距离 PCR(LD-PCR)扩增 SMART cDNA。1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 SMART cDNA 的合成,结果如图 1 所示,cDNA 的弥散带大小主要集中于 0.7kb 以上,可见合成的 cDNA 质量良好。银鲫原肠胚 SMART cDNA 连入 TOPO-XL PCR 载体后,经电转化转入 TOPO10 感受态细胞,经统计,文库的转化效率达 10^7 左右。待菌落呈现蓝白两色时,挑取了大约 1500 个白色菌落接种于 LB 液体培养基中用于斑点杂交。

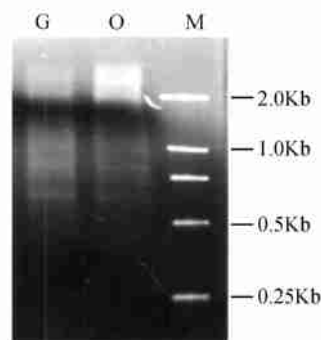


图 1 银鲫原肠胚(G)和成熟卵子(O)的 SMART cDNA。M:DL2000 DNA 分子标准量

Fig. 1 SMART cDNAs from gastrula embryos and mature eggs of *Carassius auratus gibelio*. M:DL 2000 DNA molecular weight marker

2.2 原肠胚差异表达基因的筛选

将上述来自银鲫原肠胚 SMART cDNA 文库的大约 1500 个已达到生长对数期的克隆排序,编号,每个克隆取 5 μ L 菌液分别点在两张膜上相对应的位置,并分别用原肠胚和成熟卵子的第二链 cDNA 标记的探针做点杂交。在两张膜上相同的位置,杂交

信号强度相差 5 倍以上的认为是阳性克隆。一共得到 229 个杂交阳性菌斑。再将这些菌斑以 Nested PCR primers 进行 PCR 扩增,筛选重组阳性克隆,并鉴定插入片段的大小。图 2 显示了 229 个杂交阳性菌中 14 个克隆的 PCR 结果。有部分菌斑阳性克隆为空载体或 PCR 扩增出现一条以上的条带。重组

克隆插入的 cDNA 片段基本上分布于 0.5—2.0kb 之间。对有效的 229 个 PCR 产物进行了第二轮的斑点杂交筛选,斑点筛选的结果见图 3,一共从中筛出 110 个阳性克隆。取阳性信号显著的 58 个克隆,分别进行测序。测序结果经 blast 分析表明,它们包括 25 个可查出同源已知基因的 cDNA 和 11 个查不出

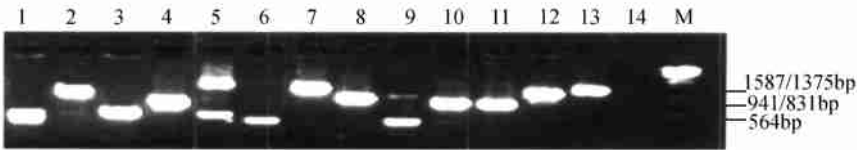


图 2 PCR 检测第一轮斑点杂交阳性克隆中 cDNA 片段的大小。1—14:从筛选的阳性克隆中随机挑取的 14 个克隆。M:λ Hind + EcoR DNA 分子量标准

Fig.2 Size identification of the cDNA fragments in the positive clones resulted from the first dot-blotting. Lanes 1—14: The 14 randomly picked positive clones from the first dot blotting. M:λ Hind + EcoR DNA molecular weight marker

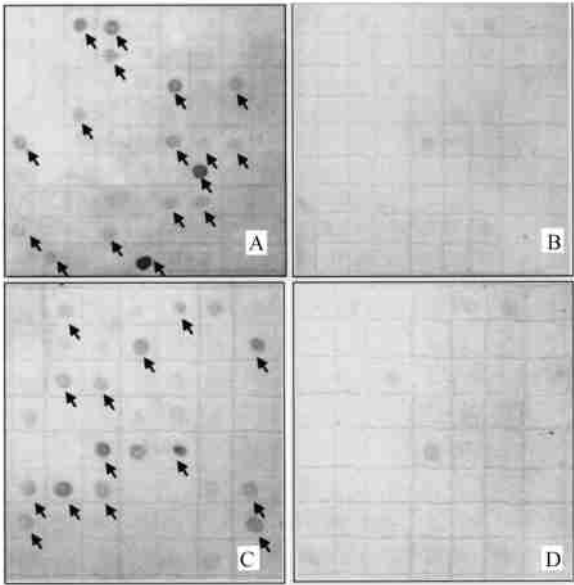


图 3 差别杂交筛选银鲫原肠胚 Smart cDNA 文库。每个克隆点在两张膜上相同的位置,分别用银鲫原肠胚(A、C)和成熟卵子(B、D) cDNA 的第二链 PCR 产物作探针杂交,杂交信号相差 5 倍以上的是阳性克隆。阳性克隆用箭头标出

Fig3. Screening of the Smart cDNA plasmid library of gastrula embryos by differential dot-blot. Two identical membranes were hybridized with probes from gastrula embryo (A, C) secondary cDNA strands and mature egg (B, D) secondary cDNA strands. Whose signals on the two membranes are different more than 5 folds are positive clones. The positive clones were indicated with arrows

同源性的可能为新基因的 cDNA (表 1);在它们之中有 11 个 cDNA 重复出现 2 次或 2 次以上,其中与阿朴脂蛋白(Apolipoprotein)同源的 cDNA 出现频率最高,在 58 个测序克隆中共出现了 7 次(表 1),占测序克隆总数的 12 %以上。

2.3 差异表达基因在胚胎发育过程中的 RT-PCR 验证

为了揭示这些差异表达基因在胚胎发育过程中的表达特征,选取以上筛选的 6 个基因进行了进一步的 RT-PCR 分析。根据这 6 个基因的 cDNA 序列,分别设计出其特异的 PCR 引物。RT-PCR 扩增结果表明,这 6 个基因在银鲫胚胎发育过程中都呈现差异表达。图 4 显示了其中 4 个基因呈现的 4 种不同的胚胎发育表达模式。例如编号为 161 的基因,虽然具有母源的 mRNA,但其含量较低,到原肠期时,其含量又明显增加,并一直维持着稳定的含量持续到出苗,这显然是在原肠期新转录的 mRNA 导致的结果(图 4A);编号为 153 和 59 的基因,如图 4B 和 4C 所示,分别从囊胚期和原肠期开始转录,此后一直呈现高水平的表达并持续到出苗;编号为 138 的基因,如图 4D 所示,从囊胚期开始转录,在尾芽和心跳期胚胎中 RNA 的含量达到最高,出苗时其含量又显著减弱,该基因可能为仅在胚胎发育期间表达的基因。

表 1 斑点杂交阳性克隆测序 cDNA 片段的大小及其同源性查询

Tab.1 Size and homologue searching of the sequenced cDNA fragments from the dot blot positive clones

克隆编号	PCR 产物大小(Kb)	测序的方向	同源性比较
74,114	1.1	3'	New gene ,withAAATAA
104,124	1.2	3'	New gene ,similar to Mus musculus hypothetical protein

续表

克隆编号	PCR 产物大小(Kb)	测序的方向	同源性比较
143 ,175 ,206	0. 95	3 ’	New gene ,withAAATAA
185	1	3 ’	New gene ,withAAATAA
67 ,138 ,73 ,184	0. 7	3 6r 5 ’	New gene ,withAAATAA
26 ,52 ,153 ,125	1. 6	3 6r 5 ’	Homo sapiens Fetuin protein B ,45 %
59 ,217	0. 9	3 ’	Anguilla japonica 14 KD apolipoprotein ,46 %
9 ,23 ,190 ,165 ,202 ,199 ,103	1. 1	5 ’	Danio rerio apolipoprotein ,84 %
168	1. 2	5 ’	Dryzius latipes annexin max3 ,56 %
192	0. 75	5 ’	copper chaperone[Canis familiaris] ,70 %
46	1. 4	3 ’	Cyprinus carpio Alpha-1-antitrypsin mRNA or serin protease inhibitor ,91 %
38	0. 9		Lctalurus punctatus Ribosomal protein L7a ,84 %
15	0. 4	3 ’	Cyprinus carpio Ribosomal protein L4 1 ,93 %
186	0. 6	5 ’	Lctalurus punctatus ribosomal protein L 18a ,88 %
226	1. 3	5 ’	Lctaluras punctatus ribosomal protein L3 ,83 %
178	0. 8	5 ’	Lctaluras punctatus Ribosomal protein L 10a ,87 %
127 ,42 ,193	1. 5	5 ’	Mus musculus HistoneH3. 3 ,93 %
144	1. 5	5 ’	Danio rerio cellular nucleic acid binding protein ,99 %
57 ,223	1. 3	5 ’	Homo sapiens fructose-1 ,6-bisphosphatase2 ,81 %
80 ,31	0. 9	3 ’	Danio rerio histone variant H2A ,92 %
36	1. 4	5 ’	Danio rerio Type cytokeratin ,enveloping layer ,87 %
12	1. 6	3 ’	Goldfish large ribosomal RNA ,96 %
19	0. 9	5 ’	Danio rerio ran binding protein ,88 %
159	1. 8	3 ’	Homo sapiens adenosine kinase ,89 %
161 ,220	0. 9	5 ’	Homo sapiens Histone H2A purine rich binding element protein B ,100 %
198	0. 9	5 ’	Xenopus laevis RNA binding motif protein Y14 ,81 %
221	1. 3	5 ’	Mus musculus translocase of inner mitochondrial membrane 9 homolog ,82 %
3	1. 5	5 ’	Danio rerio α -tubulin ,84 %
89	3	5 ’	Danio rerio β -tubulin ,87 %
117	1. 2	5 ’	Homo sapiens Dystrophin-related protein ,46 %
115	1	3 ’	New gene ,without AAATAA
51	2	3 ’	New gene ,without AAATAA
16	3	3 ’	New gene ,without AAATAA
225	1. 5	3 ’	New gene ,without AAATAA
62	1	3 ’	New gene ,without AAATAA
210	0. 5	3 ’	New gene ,without AAATAA

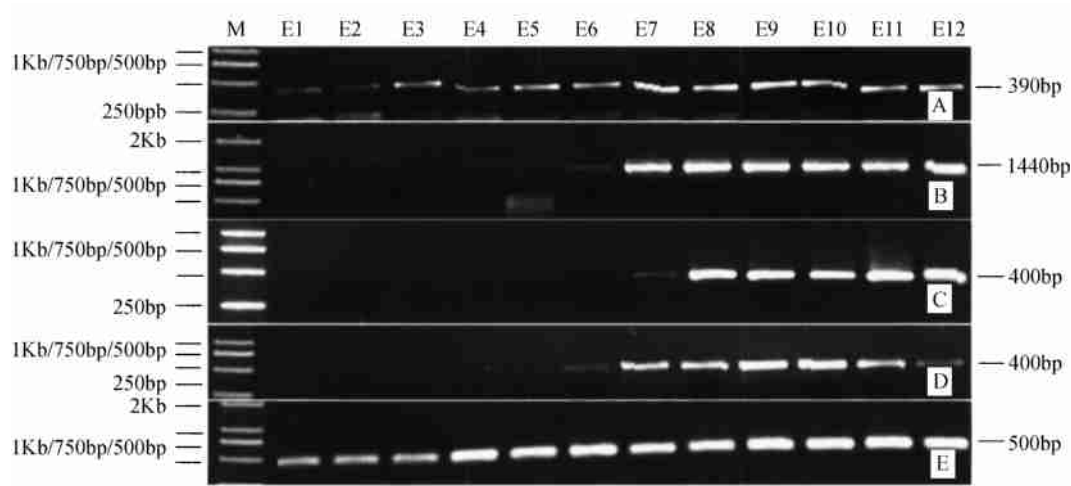


图4 差异表达基因(A-161;B-153;C-59;D-138;E- α tubulin 对照)在卵子和胚胎发育不同时期的 RT-PCR 检测。E1-未受精卵;E2-受精 5min; E3-受精40min; E4-多胞期; E5-桑椹胚; E6-囊胚; E7-原肠胚; E8-神经胚; E9-尾芽期; E10-心跳期; E11-出苗前期; E12-出苗期。M:DL 2 000DNA 分子量标准

Fig. 4 RT-PCR detection of differentially expressed genes(A-161;B-153;C-59;D-138;E- α tubulin control) at different stages during embryogenesis. E1-unfertilized egg; E2-5min after fertilization; E3-40min after fertilization; E4-multicellular stage; E5-morula; E6-blastula; E7-gastrula; E8-neurula; E9-tail bud stage; E10-heartbeat stage; E11-hatching; E12-larvae. M:DL 2 000 DNA molecular weight marker

3 讨论

原肠胚是胚胎发生中一个极为重要的时期,在中囊胚转换点后,合子核开始大量表达新的 RNA 和蛋白质,参与指导胚胎的图式形成和胚层的分化、细胞的定位和迁移以及细胞的分化,某些指导器官形成和分化的基因也可能开始大量表达。虽然本实验室已报道了银鲫胚胎发育中差异表达基因筛选的部分结果^[18-22],但这些工作都着重于银鲫胚胎发育后期参与器官形成的基因的筛选。本研究以银鲫原肠期胚胎中大量表达的基因作为筛选对象,主要筛选一些在中囊胚转换点以后合子核开始大量表达的基因,着重于筛选一些参与指导胚层分化、图式形成和细胞定位的调节因子。

近年来,在斑马鱼中已经鉴定和克隆了一些参与胚胎早期发育的重要的调控因子^[5-11],但是对于内胚层的分化和调节机制的研究才刚刚起步^[4,29-30]。例如参与内胚层分化的 Nodal 通路的信号因子 Cas 的上游基因迄今还未鉴定到^[4];鱼类胰腺分化早期的标记基因还有待继续鉴定^[29],鱼类肝胰腺以及消化道的原基分化,器官生成以及生长的分子调节机制还需进一步的补充和完善^[4,29-30]。本实验采用的差别筛选方法由 Kajiwara 等于 1996 首次报道,利用这个方法, Kajiwar 等成功克隆到多个与突发中风相关的基因,并证实突发中风与胞内钙离子作用相关^[23]。尽管应用差别筛选分离克隆目

的基因存在许多局限,低丰度的 mRNA 很难用此法检测出来^[31],但是,差别筛选也有其优势,即分离出来的阳性克隆为全长 cDNA。而本实验室常用的抑制性差减杂交技术虽然在筛选差异表达基因上具有明显优势,例如其假阳性比率明显降低,同时低丰度差异表达的基因在应用抑制性差减杂交技术时也容易克隆到^[19-22],但是其克隆到的只是基因片段,对于银鲫这个多倍体物种而言,再利用 3' RACE 和 5' RACE 的方法去获得基因全长,需要花费更多的精力。当然,以多倍体物种为研究对象,进行大规模的差异表达基因的筛选时,本实验室根据多年的实验经验,认为最好的方法是将抑制性差减杂交的文库标记为探针,筛选目的 SMART cDNA 文库,这样低丰度、差异表达的基因也容易筛选到,而且不需要利用 RACE 的方法扩全长,只是需要筛选的克隆数量较大。

本实验筛选的差异表达的基因包括一些在银鲫胚胎发育中起重要作用的基因,大量的为参与转录和翻译的调控因子和核糖体蛋白;以及一些在胚胎早期大量表达的参与脂类代谢的脂蛋白;和一些不知功能的新基因。如表 1 中所示,在胚胎发育早期,表达丰度较高的基因,主要是一些为满足鱼类胚胎细胞快速分化而必须的调控因子和一些为了满足鱼类胚胎发育而必需的一些卵黄蛋白代谢因子以及可能的与胚层分化、细胞定位和迁移有关的调节因子。对其中一些基因利用胚胎发育不同时期的 RT-PCR 检测进一步验证了其在胚胎发育过程中的表达差异

(图 4),这同时也映证了利用差别杂交的方法能有效筛选到差异表达基因。另外,对于其中的一些基因作者正在对其进行表达特征及其功能研究,相关结果我们将陆续报道。

参考文献:

- [1] Gui J F, Yi M S. Developmental Biology [M]. Beijing: Science press. 2002, 113 [桂建芳, 易梅生, 发育生物学, 北京: 科学出版社. 2001, 113]
- [2] Gui J F. Zebrafish, the ideal model for the study of molecular developmental biology[J]. *Bioengineering progress*. 1995, 16(3): 30—33 [桂建芳. 分子发育学研究的理想模式-斑马鱼. 生物工程进展. 1995, 16(3): 30—33]
- [3] Zhu Z Y, Sun Y H. Embryonic and genetic manipulation in fish[J]. *Cell Research*. 2000, 10(1): 17—27
- [4] Ober E A, Field H A, Stainier D Y R. From endoderm formation to liver and pancreas development in zebrafish[J]. *Mech. of Dev*. 2003, 120: 5—18
- [5] Rebagliati M R, Toyama R, Fricke C, et al. Zebrafish Nodal-Related Genes Are Implicated in Axial Patterning and Establishing Left-Right Asymmetry[J]. *Developmental Biology*, 1998, 199: 261—272
- [6] Kikuchi Y, Agathon A, Alexander J, et al. Casanova encodes a novel Sox-related protein necessary and sufficient for early endoderm formation in zebrafish[J]. *Genes & Development*, 2001, 15: 1493—1505
- [7] Feldman B, Gates M A, Egan E S, et al. Zebrafish organizer development and germ layer formation require nodal-related signals[J]. *Nature*, 1998, 395: 181—185
- [8] Rebagliati M R, Toyama R, Haffter P, et al. cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998b, 95: 9932—9937
- [9] Zhang J, Talbot W S, Schier A F. Positional cloning identifies zebrafish *one-eyed pinhead* as a permissive EGF related ligand required during gastrulation[J]. *Cell*, 1998, 92: 241—251
- [10] Kikuchi Y, Trinh L A, Reiter J F, et al. The zebrafish *bonnie and clyde* gene encodes a Mix family homeodomain protein that regulates the generation of endodermal precursors[J]. *Genes & Development*, 2000, 14: 1279—1289
- [11] Henry G L, Melton D A. Mixer, a homeobox gene required for endoderm development[J]. *Science*. 1998, 281: 91—96
- [12] Jiang Y G, Liang S C, Cheng B D. The biological effect of heterogenous sperms in the gynogenesis offspring of silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 1983, 8(1): 1—13 [蒋一翀, 梁绍昌, 陈本德. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. 水生生物学报. 1983, 8(1): 1—13]
- [13] Gui J F, Liang S C, Zhu L F, et al. Discovery of two different reproductive development modes of the eggs of artificial multiple tetraploid allogynogenetic silver crucian carp [J]. *Chin. Sci. Bull.* 1993, 38(4): 332—337
- [14] Gui J F. A unique study system: gynogenetic fish, *Carassius auratus gibelio* [J]. *Sci. Found. China*. 1996, 4: 44—46
- [15] Gui J F. Retrospect and prospect of studies on the mechanism of natural gynogenesis in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Bull. Nat. Natl. Sci. Found. China*. 1997, 11: 11—16
- [16] Zhou L, Wang Y, Gui J F. Genetic evidence for gonochoristic reproduction in gynogenetic silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio* Bloch) as revealed by RAPD assays [J]. *J. Mol. Evol.* 2000, 51: 498—506
- [17] Zhou L, Gui J F. Karyotypic diversity in polyploid gibel carp, *Carassius auratus gibelio* Bloch [J]. *Genetica*. 2002, 115(2): 223—232
- [18] Shi Y H, Liu J, Xia J H, Gui J F. 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
- [19] Liu J, Shi Y H, Ying J, et al. Screen for stage-specific expression genes between gastrula and tail bud stage in embryogenesis of gynogenetic silver crucian carp [J]. *Acta Genetica Sinica*. 2004, in press [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲫原肠期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的呈现. 遗传学报, 2005, 印刷中]
- [20] Liu J, Shi Y H, Ying J, et al. The cloning and characterization of two gene related to protein synthesis in gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, 27(5): 512—520 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 银鲫两个蛋白合成相关基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析. 水生生物学报, 2003, 27(5): 512—520]
- [21] Liu J, Shi Y H, Ying J, et al. Cloning and characterization of four full length cDNA of hatching enzyme genes in gynogenetic gibel carp [J]. *High Technology Letters*, 2003, 151(13): 38—45 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲫四种孵化酶基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析 [J]. 高技术通讯. 2003, 151(13): 38—45]
- [22] Shi Y H, Liu J, Xia J H, et al. Cloning and expressional characterization of creatine kinase MB-CK in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*. 2003, 49(5): 637—645 [石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 银鲫肌酸激酶 MB-CK cDNA 的克隆及其表达特征. 动物学报, 2003, 49(5): 637—645]
- [23] Kajiwara K, Nagawawa H, Shimizu Nishikawa K, et al. Molecular characterization of seizure-related genes isolated by differential screening [J]. *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 1996, 219: 795—799
- [24] Wu C, Gui J F. Fish Genetics and Breeding Engineering [M]. Shanghai: Scientific and Technical Publishers. 1999, 41—62 [吴清江, 桂建芳. 鱼类遗传育种工程. 上海: 科学技术出版社. 1999, 41—62]
- [25] Zhang Y B, Shi Y H, Gui J F. Construction of antiviral subtractive cDNA library of cultured fish cells [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica* 2003, 27(1): 113—118 [张义兵, 石耀华, 桂建芳. 鱼类培养细胞抗病毒差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 2003, 27(1): 113—118]
- [26] 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
- [27] Xie J, Wen J J, Chen B. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J].

- Gene*. 2001 ,271 :109 —116
- [28] Zhang Y B , Zhang Q Y , Xu D Q , *et al.* Identification of antiviral-relevant genes in the cultured fish cells induced by inactivated virus [J]. *Chinese Science Bulletin* , 2003. 48 (6) :581 —588
- [29] Lammert E , Cleavera O , Meltona D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development [J]. *Mechanisms of Development* , 2003 ,120 :59 —64
- [30] Field H A , Ober E A , Roeser T , *et al.* Formation of the digestive system in zebrafish :I. Liver morphogenesis. *Dev. Biol.* , 2002 ,253 (2) :279 —290
- [31] Wu L H. *Gene engineering principle* [M]. Beijing :Scientific press , 1998[吴乃虎. 基因工程原理(上). 北京 :科学出版社 ,1998]

SCREENING OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES AT GASTRULA STAGE DURING EMBRYOGENESIS OF *CARASSIUS AURATUS GIBELIO*

LIU Jing-Xia ,SHI Yao-Hua and GUI Jian-Fang

(*Institute of Hydrobiology , The Chinese Academy of Sciences , State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology ;
Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430072*)

Abstract : Embryogenesis is a progressive and complicated process that is regulated by differential gene activity. In order to identify some differentially expressed genes in early embryogenesis ,two kinds of SMART cDNAs were respectively synthesized from mature eggs and gastrula embryos of *Carassius auratus gibelio* ,and the gastrula embryo SMART cDNA library was constructed. Following this program ,131 positive clones were screened from about 1500 clones of the gastrula embryo SMART cDNA library by two rounds of dot-blot differential hybridizations using the synthesized SMART cDNAs as probes. Furthermore ,58 positive clones were selected for sequencing. Searching GenBank by the nucleotide sequences indicated that most of the sequenced cDNAs encoded ribosome proteins and regulators involved in translation and transcription ,and some encoded lipoproteins involved in the metabolism of fat. And ,some unknown new genes were also identified from the screening. Moreover ,we investigated the expression patterns of 6 genes during embryogenesis by RT-PCR analysis ,and confirmed their differential expression during embryogenesis. Four different expression patterns ,such as transcribing again at gastrula based on the maternal products ,beginning to transcribe at blastula stage , beginning to transcribe at gastrula stage ,and transcribing only during embryogenesis , were revealed in the analyzed genes. Through this study ,we cloned and identified some genes expressed differentially at early stage during embryogenesis ,which will be a solid base for further researches on their functions and regulative mechanisms during embryogenesis.

Key words : *Carassius auratus gibelio* ; Gastrula ; Embryogenesis ; SMART cDNA library ; Differential screening