

鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建

张义兵 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, 武汉 430072)

摘要: 紫外线灭活的草鱼出血病病毒(GCHV)能诱导鲫囊胚培养细胞(CAB)产生高滴度的干扰素, 从而诱导宿主细胞基因表达的改变并处于抗病毒状态。提取灭活病毒诱导未经病毒诱导的 CAB 细胞 mRNA, 利用抑制性差减杂交技术, 成功构建了鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库。以鲫管家基因 α -tubulin 和 β -actin 作为差减指标, 检测差减 cDNA 文库的差减效率分别高达 2^{15} 和 2^7 倍, 表明经过病毒诱导后的细胞中, 某些差异表达基因的富集效率也接近 2^{15} 倍。鱼类抗病毒基因差减 cDNA 文库的建立对快速分离、克隆鱼类抗病毒相关基因和认识鱼类细胞抗病毒免疫的分子机理有重要意义。

关键词: 鱼类; 草鱼出血病病毒; 抗病毒相关基因; 诱导; 抑制性差减杂交

中图分类号: S941.41 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)02-0113-006

鱼类病毒病是严重影响当今世界水产养殖产量的主要制约因素之一。长期以来对鱼类病毒病仍无有效的防治方法, 较为成功的是使用疫苗。目前能够用于养殖的病毒疫苗极为有限, 而且某些疫苗虽能有效控制病毒病, 但仍然不能彻底根治鱼类病毒病的危害^[1]。使用疫苗除费时、费力, 不适于大面积水面养殖外, 还可能由于病毒抗原漂移和新毒株的出现、以及母源抗体的干扰等原因导致疫苗接种失败^[1,2]。而分离鱼类自身抗病毒基因、构建转基因鱼, 可能是彻底解决鱼类病毒病的最为理想途径。

然而, 在鱼类目前不仅没有得到有效的抗病毒基因, 而且对鱼类感染病原后的免疫机制也缺乏了解 and 认识^[1]。抑制性差减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH)技术常用于快速分离和克隆差异表达基因^[3-5]。近年来的研究表明, 紫外线灭活的草鱼出血病病毒能诱导多种鲤科鱼类培养细胞高效表达干扰素(Interferon, IFN)^[6], 粗制鲫干扰素对草鱼出血病有较好的防治作用^[7]。同哺乳类 Type I IFN 一样, 鲫干扰素具有广谱抗病毒活性, 其抗病毒机制在于诱导宿主细胞基因表达的改变, 包括一系列抗病毒基因的表达, 致使细胞处于抗病毒状态^[1,8]。利用 SSH 技术构建鱼类抗病毒基因 cDNA 文库, 不仅能快速扫描、鉴定鱼类对病毒感染引起免

疫反应的基因或抗病毒基因, 丰富鱼类抗病毒免疫机理的认识, 而且克隆的抗病毒基因可以直接应用于鱼类基因工程的抗病毒育种探索。本文报道运用 SSH 技术建立鱼类抗病毒基因差减 cDNA 文库的结果。

1 材料与方法

1.1 细胞与病毒 鲫囊胚细胞系(Blastulae embryonic cells of crucian carp, CAB)由本实验室建立^[9], 草鱼肾细胞系[Kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), CIK]由中国水产科学院长江水产研究所建立^[10]。细胞用 10% 新生牛血清(杭州四季青产品, 使用时 56℃灭活 30min)的 TC-199(GIBCO 产品)培养基置 28℃培养^[9]。草鱼出血病病毒(Grass carp hemorrhage virus, GCHV)^[11]在 CIK 细胞上扩增并检测病毒滴度。

1.2 GCHV 紫外线照射灭活 CAB 细胞干扰素用紫外线灭活的 GCHV 诱导, 采用本实验室的灭活装置和方法^[6]。病毒灭活前先进进行初步纯化: 6000r/min、4℃离心 20min, 收集上清, 然后 24000r/min、4℃超速离心 1.5h, 病毒沉淀用适量无血清 199 培养基稀释, 继续 6000r/min 离心 20min 取上清得纯化病毒。然后用紫外线照射灭活 5min。常规方法测定病毒灭活前后的

收稿日期: 2001-12-01; 修订日期: 2002-11-11

基金项目: 国家自然科学基金(30200207); 武汉青年科技晨光计划(20015005055)资助

作者简介: 张义兵(1969—), 男, 湖北省仙桃市人; 遗传学硕士; 主要从事鱼类遗传学和分子免疫学的研究

通讯作者: 桂建芳, E-mail: jfgui@ihb.ac.cn

滴度,检测病毒灭活效率。

1.3 培养细胞总 RNA 的提取及 mRNA 的纯化

CAB 细胞传代于 25cm² 培养瓶,置 28℃培养 4d 成致密单层。去掉细胞培养上清液,用无血清培养基洗 1 次,每瓶加入 0.5mL 紫外线灭活的 GCHV,28℃吸附 4h。对照细胞每瓶加入 0.5mL 的培养基。去掉病毒诱导液,用无血清培养基洗 3 次,再加入无血清培养基,28℃继续培养细胞 12h,收集细胞培养上清液,以孔径为 10nm 的微孔滤器过滤细胞碎片,采用微量细胞病变 (CPE) 抑制法检测干扰素滴度^[6]。病毒诱导或未经诱导的 CAB 细胞采用 CsTFA 超速离心法提取总 RNA (Pharmacia RNA Extraction Kit),Poly A⁺ RNA 用生物素标记的寡聚 (dT) 探针和链亲合素包裹的磁珠纯化 (PolyAtract mRNA Isolation system (Promega))。总 RNA 和 mRNA 用分光光度计测定浓度。

1.4 抑制性差减杂交和抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建

按本实验室已经报道的方法^[3-5],采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit (Clontech) 进行差减杂交。以紫外线灭活 GCHV 诱导过的细胞 PolyA⁺ RNA 制备 Tester cDNA,未经病毒诱导的细胞 PolyA⁺ RNA 平行制备 Driver cDNA。Driver cDNA 的制备是:2μg PolyA⁺ RNA 首先逆转录合成双链 cDNA,然后 RsaI 充分酶切 3h 后完成。Tester cDNA 的制备是:2μg PolyA⁺ RNA 经逆转录、充分酶切,酶切后的双链 cDNA 被分成两份,分别连接两种不同的接头 adaptor1 和 adaptor2R 后完成 Tester 1 和 Tester 2 cDNA。

将成功制备的 Driver cDNA 和 Tester cDNA 进行两轮杂交。第一轮,过量的 Driver cDNA 加到每份 Tester cDNA,98℃变性后,68℃杂交 10h,差异表达基因 cDNA 片段不与 Driver cDNA 杂交而形成单链。紧接着进行第二轮杂交,不经变性迅速将两份第一次杂交的样品混合,同时加入变性后的 Driver cDNA,混匀后 68℃继续杂交 10h,差异表达的单链 cDNA 重新退火形成有不同接头末端的双链 cDNA。杂交产物再经过两轮 PCR 反应。第一轮 PCR 采用 Adaptor1 和 Adaptor2R 的共有序列引物 PCR Primer1,扩增参数为:75℃ 5min,然后 94℃ 10s,66℃ 30s,72℃ 1.5min 共 27 个循环,只有杂交形成两端具有不同接头的 cDNA 片段才能够扩增。第二轮 PCR 采用的是套式 PCR 引物 (Nested primer1 和 Nested primer 2R),扩增参数为:94℃ 10s,68℃ 30s,72℃ 1.5min 共 10 个循环,进一步降低文库背景、指数扩增差异表达 cDNA。两轮 PCR 后即完成抗病毒基因差减 cD-

NA 文库的构建。

制备差减 cDNA 的同时,也制备未差减 cDNA 以检测差减文库的差减效率。未差减的 cDNA 的制备是:在制备 Tester cDNA 连接两种接头时,将刚加好样还没有进行连接反应的 Tester 1 和 Tester 2 cDNA 各取 2μL 混合,然后进行连接反应完成。未差减的 cDNA 不进行差减杂交。

1.5 接头连接效率和差减效率的检测

检测 Tester cDNA 的接头连接效率时以管家基因 α -tubulin 为指标。以鲫 α -tubulin 的特异上游引物 (5' GTGCACTG-GTCTTCAGGGGTT3') 和下游引物 (5' GGGAAGTGAT-GCGTGGGTAT3') 为一个组合、以及试剂盒提供的接头引物 PCR primer 1 (5' CTAATACGACTCACTATAGG-GC3') 和 α -tubulin 的下游引物为一个组合进行 PCR 扩增,比较不同引物组合扩增产物的大小及产量,鉴定连接效率的优劣。PCR 反应条件为:94℃ 5min,然后 94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 1min 扩增 30 个循环。检测差减 cDNA 文库的差减效率以管家基因 α -tubulin 和 β -actin 为指标。 β -actin 基因的上游引物和下游引物序列分别为:5' CACTGTGCCCATGTACGAG3', 5' CCATCTCCTGCTCGAAGTC3'。PCR 反应条件同上,只是反应循环数因具体情况而定。

1.6 差减文库 cDNA 片段大小检测

将制备的差减 cDNA 直接连接到 pGEM-T 质粒载体 (Promega),即得到差减 cDNA 质粒文库。转化大肠杆菌 JM109,在 X-gal/IPTG 琼脂平板上随机挑选白色菌落 37℃ 培养 2h 以上。取 1μL 菌液,以差减试剂盒提供的引物 Nested 1 和 Nested 2R 在 25μL 体系 PCR 检测插入片段大小。PCR 扩增参数为:94℃ 15s,65℃ 30s,72℃ 2min 共 30 个循环。

2 结果

2.1 培养细胞抗病毒状态的诱导及检测

选 6 瓶生长状态良好、传代 4d 的 CAB 细胞,其中 3 瓶细胞用灭活病毒诱导干扰素,另外 3 瓶细胞同期加入等体积的无血清培养基作无病毒诱导对照。细胞诱导 4h 后去掉诱导液或培养基,加入新鲜的无血清培养基继续培养 12h,然后提取细胞总 RNA。

干扰素滴度参照本实验室方法进行^[6,8]。将培养细胞上清液按 3× 比例稀释加入 96 孔微孔板,28℃保护细胞 10h,然后每孔加入 1000TCID₅₀/mL 病毒 0.1mL,两天后观察结果。病毒诱导的培养基中干扰素滴度高达 2500U/mL,对照细胞培养液抗病

毒滴度为 0。表明 CAB 细胞经紫外线灭活的 GCHV 诱导后已经产生大量的干扰素, 而干扰素又重新激活细胞的抗病毒基因表达, 处于抗病毒状态^[8]。因此, 这两种细胞的基因表达已经表现出显著差异, 可以提取细胞 mRNA 进行下一步实验。

2.2 细胞总 RNA 的提取

用 CsTFA 超速离心的方法提取灭活病毒诱导的 CAB 细胞和未经病毒诱导的对照细胞总 RNA, 分光光度计测定 RNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值在 1.7 以上。琼脂糖凝胶电泳检测, 28S、18S 条带清晰, 且 28S 浓度大于 18S 的两倍, RNA 弥散带位于 0.5kb 以上。表明已经获得纯度和质量都较好的总 RNA (图 1)。

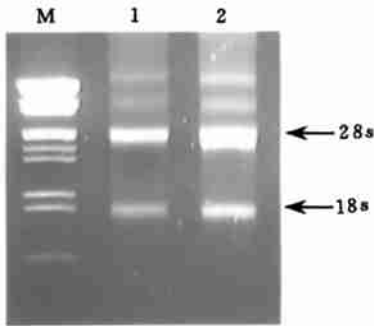


图 1 经过灭活病毒诱导和未经诱导的 CAB 细胞总 RNA
M: *NotI* + *HindIII* 双酶切分子量标准。1、2 分别为
未经病毒诱导和诱导过的 CAB 细胞总 RNA
Fig. 1 Total RNAs isolated from CAB cells infected by UV⁻ inactivated
GCHV and mock infected cells
M: *NotI* + *HindIII* DNA molecular weight marker. Lane1: total
RNAs isolated from mock infected cells; Lane 2: total RNAs isolated from
CAB cells induced by UV⁻ inactivated GCHV

2.3 Driver cDNA 和 Tester cDNA 的制备

用生物素标记的寡聚探针和链亲合素包裹的磁珠纯化 mRNA, 分光光度计定量, 然后各取 2μg 病毒诱导和未经诱导的 CAB 细胞 polyA⁺ RNAs, 按照差减试剂盒提供的试剂和步骤逆转录合成双链 cDNA, 再经 *RsaI* 充分酶切双链 cDNA 后, 源于未经诱导的细胞 polyA⁺ RNA 的酶切双链 cDNA 即为 Driver cDNA。而病毒诱导的双链 cDNA 分为两份后, 还需分别加上两种接头 adaptor1 和 adaptor2R 才完成 Tester 1 cDNA 和 Tester 2 cDNA 的制备。

加接头的目的是在差减杂交之后可以用特异的引物 PCR 扩增差异表达基因 (即差减杂交中的最后两轮 PCR 扩增), 使差异表达基因、特别是稀有表达基因得到富集, 因此是非常关键的一步。图 2 显示了检测 Tester 1 cDNA 和 Tester 2 cDNA 的接头连接效率的结果。1、3 道用 α tubulin 的上游和下游引物

做 PCR, 2、4 道用 Adaptor1 和 Adaptor2R 的共有序列的引物——PCR Primer1 以及 α tubulin 的下游引物扩增。如果连接成功, 则 2、4 道的 PCR 产物将大于 1、3 道。图中所有泳道上样量相同, 可见 2、4 道产物明显大于 1、3 道, 引物组合的 PCR 扩增产量相近。以上结果显示接头连接效率较高。

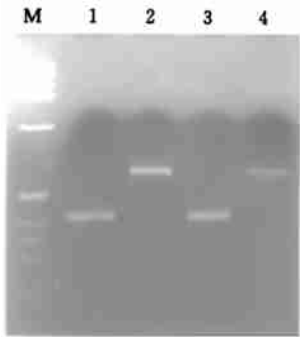


图 2 PCR 检测接头连接效率
M: 1kb DNA 分子量标准。1、3: 用 α tubulin 的上游和下游引物做
PCR; 2、4: 用 PCR Primer1 以及 α tubulin 的下游引物做 PCR
Fig. 2 Results of the adaptor ligation efficiency analysis by PCR
M: 1kb DNA marker. Lanes 1 and 3: PCR products are generated by up-
stream and downstream primers of α tubulin; Lanes 2 and 4: PCR products
are generated by PCR primer 1 and downstream primer of α tubulin

2.4 抗病毒基因差减 cDNA 文库的建立

成功制备的 Driver cDNA 和 Tester cDNA 按照试剂盒手册的详细步骤分别做两轮杂交和两轮 PCR 即完成抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建。图 3 为差减 cDNA 和未经过差减杂交的 cDNA 的第一轮和

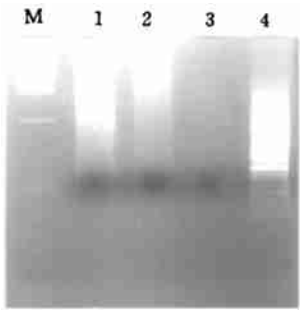


图 3 以差减和未经差减的 cDNA 为模板的两次 PCR 反应结果
M: 1kb DNA 分子量标准; 1 和 3: 第一次 PCR 扩增产物; 2 和 4:
第二次 PCR 扩增产物。1 和 2 以未差减 cDNA 为模板; 3 和 4
以经过差减的 cDNA 为模板
Fig. 3 The 1st and 2nd PCR products of both subtracted and unsorted
cDNA as templates
M: 1kb DNA marker. Lane 1 and 3: 1st PCR products generated by un-
sorted and sorted cDNA as templates, respectively; Lane 2 and
4: 2nd PCR products generated by unsorted and sorted cDNA as
templates, respectively

第二轮 PCR 产物电泳图谱。从图中可以看出, 经过差减杂交的 cDNA 的 PCR 产物主要集中在 0.5—2kb 之间, 与未经差减的 cDNA 为模板的两次 PCR 产物呈现不同的电泳谱带。结果初步显示已经成功建立了抗病毒基因的差减 cDNA 文库。

2.5 抗病毒基因差减 cDNA 文库的差减效率检测

为了检测抗病毒基因差减 cDNA 文库的差减效率, 以鲫管家基因 α -tubulin 和 β -actin 做检测指标, 通过比较它们在经过差减和未经差减杂交的 cDNA 中

丰度的相差倍数, 以估计差减杂交效率。以没有经过差减的 cDNA 为模板, α -tubulin 基因在 18 个循环即可扩增较强的带, 而在经过差减杂交的 cDNA 中直到 33 个循环后才扩增出非常弱的带(图 4A), 因此对于 α -tubulin 基因, 差减杂交将其减弱了至少 $2^{(33-18)} = 2^{15} \approx 32000$ 倍, 反过来表明差减杂交可能将某些特有的差异表达 cDNA 富集了同样的倍数。但是, 很显然不同的基因富集的倍数不相同, 图中显示 β -actin 基因被差减了近 2^7 倍(图 4B)。

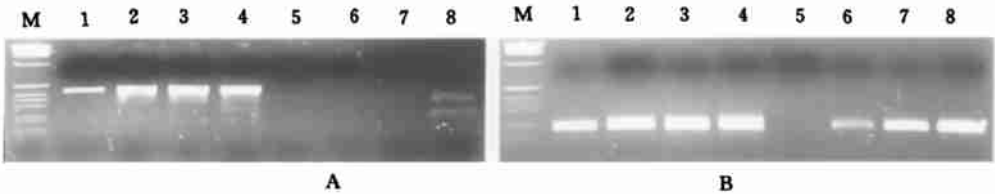


图 4 以 α -tubulin (A) 和 β -actin (B) 为指标 PCR 检测 cDNA 文库的差减杂交效率。以未做差减的 cDNA(泳道 1—4) 和差减的 cDNA(泳道 5—8) 为模板, α -tubulin (A) 和 β -actin (B) 的上下游引物作 PCR 扩增。1 和 5: 18 个循环; 2 和 6: 23 个循环; 3 和 7: 28 个循环; 4 和 8: 33 个循环。M: 1kb DNA 分子量标记

Fig. 4 Reduction of α -tubulin (A) and β -actin (B) abundance in antiviral cDNA library. PCR analysis was performed on unsubtracted (Lanes 1—4) or subtracted (Lanes 5—8) secondary PCR products with the primes of both α -tubulin (A) and β -actin (B), respectively. Lane 1 and Lane 5: 18 cycles; Lane 2 and Lane 6: 23 cycles, Lane 3 and 7: 28 cycles, Lane 4 and Lane 8: 33 cycles. M: 1kb DNA Marker

2.6 抗病毒基因差减 cDNA 文库中 cDNA 片段大小的检测

将差减 cDNA 连接到质粒 pGEM-T 载体, 转化细

菌后, PCR 检测质粒插入 cDNA 片段, 大小均在 0.2kb—2kb 之间。图 5 显示随机挑选 16 个克隆的 PCR 检测结果。

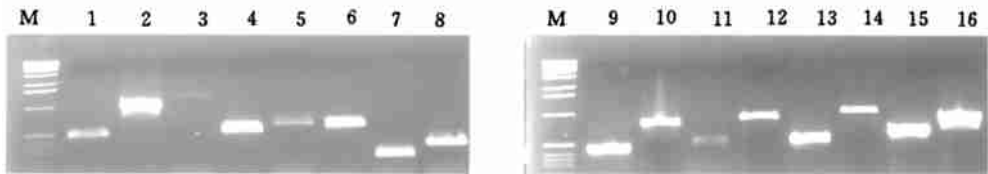


图 5 PCR 鉴定抗病毒差减文库中 cDNA 片段的大小。1—16 从差减文库中随机挑选的克隆。M: 1kb DNA 分子量标准

Fig. 5 PCR identification of the cDNA fragments from the antiviral subtractive library. Lanes 1—16: The 16 randomly picked colonies from the subtractive library. M: 1kb DNA Marker

3 讨论

要建立成功的抗病毒基因差减 cDNA 文库, 首先要确定用于制备 Tester cDNA 的细胞确实有抗病毒基因的表达, 与制备 Driver cDNA 的细胞有显著的基因表达差异。以前的实验结果表明, 紫外线灭活的 GCHV 是一种高效的干扰素诱导剂, 培养细胞经病毒诱导后, 在最初的 14h 内, 细胞培养上清液干扰素滴度急剧上升^[6]。病毒诱导的细胞在去掉培养基

后再加入 2×10^5 TCID₅₀ 的 GCHV, 逐日观察, 细胞日趋老化, 3d 后仍没有发现病毒感染的症状(结果未发表)。这表明经病毒诱导后的细胞, 除早期分泌干扰素外, 同时也在稍后一段时间内表达抗病毒基因, 使细胞处于抗病毒状态^[8, 12]。事实上, 除了病毒直接诱导细胞相关基因的表达外, 细胞分泌到培养基中的干扰素可反作用于没有受到病毒感染的细胞表达干扰素诱导的基因, 包括抗病毒相关基因, 从而使细胞处于抗病毒状态。早期的研究结果表明干扰素

作用细胞 1h 就能观察到对细胞的保护^[8]。在本实验中, 细胞首先经病毒诱导 4h 后再继续培养了 12h, 因此抗病毒相关基因应该充分得到表达。

要成功运用 SSH 技术首先必须有质量和纯度较好的 RNA 或 polyA⁺ RNA, 保证反转录合成高质量的双链 cDNA。双链 cDNA 经酶切后, 很关键的一步就是 Tester cDNA 的制备, 即与人工接头的连接。连接效率高直接关系到差减杂交的成败, PCR 方法可以方便地检测连接效率。作者用不同的引物组合以连接接头后的 Tester cDNA 为模板扩增管家基因 α -tubulin, 不仅得到了预期大小的产物, 而且扩增产量接近(图 2), 表明连接成功。

PCR 方法同样可以方便检测差减文库的差减效率。虽然以差减和未差减过的 cDNA 为模板, 连续作两次 PCR, 从其扩增产物图谱不一致就能在一定程度上看出差减文库已取得成功, 但是检测在病毒诱导和没有诱导的细胞都表达的管家基因的差减倍数, 可以定量反映差异表达基因的富集程度。实验中, 发现两种管家基因 α -tubulin 和 β -actin 在建立的文库中的差减效率有很大不同, α -tubulin 被差减了近 2¹⁵ 倍, β -actin 差减了近 2⁷ 倍。这表明在差减文库中, 由于不同基因的表达量有差异, 因此被富集(或差减)的程度是不相同的。这种差异的产生有可能是一种随机性的结果(如在差减杂交后最后两轮 PCR 时, 随机取出了丰度极低、但两端有不同接头的某种管家基因 cDNA 分子为模板, 这样即使经过了抑制性 PCR, 但如果以这种管家基因作为差减效率的检测指标, 可能不会真实反映文库的差减效率), 并且在不同的细胞或不同种, 由于不同管家基因的表达量的差异, 它们的差减程度也会不同。然而不管怎样, 本实验中 α -tubulin 和 β -actin 较高的差减效率无疑反映了差异表达基因的富集程度, 其中就包括抗病毒基因。因此也初步表明所建立的抗病毒基因差减 cDNA 文库是成功的。

目前, 不仅缺乏对病毒感染鱼类机制的了解, 而且对感染病毒的鱼类免疫反应机制也认识有限。鱼类对病毒的天然免疫包括组成型和反应型。前者主要包括一些非特异性的、能吞噬感染病毒的毒性细胞, 而后者主要是干扰素的作用^[13]。在哺乳类, 干扰素能诱导宿主细胞许多抑制病毒的蛋白表达, 如 2',5'-A 合成酶、蛋白激酶 P1 以及 Mx 蛋白等^[14]。虽然在某些鱼类和鱼类细胞系已经证明有干扰素活性的表达^[15,16], 但是至今没有分离到干扰素蛋白和基因^[13]。即使在某些鱼类已经克隆到 Mx 基

因^[17-20], 也没有发现其表达产物有抗病毒作用^[18]。因此克隆鱼类抗病毒免疫相关基因就显得尤为重要, 而差减 cDNA 文库的成功建立将有助于加速分离、鉴定、克隆病毒诱导的鱼类细胞自身抗病毒免疫相关基因。

参考文献:

- [1] Zhang Y B, Yu X M. Progresses in studies on fish interferon [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*. 2000, 7(3): 97—101 [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]
- [2] Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. Recent developments in fish vaccinology [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999, 72: 203—312
- [3] 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
- [4] 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 embryo genesis of gynogenetic silver crucian carp [J]. *Cell Research*, 2002, 12(2): 133—142
- [5] 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
- [6] Wang T H, Zhang Y B, Li G Q, et al. Interferon induction in cultured fish cells [J]. *Chinese Journal of Virology*, 1999, 15(1): 43—49 [王铁辉, 张义兵, 李戈强等. 鱼类培养细胞干扰素的诱导 [J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 43—49]
- [7] Jia F J, Wang T H, Zhang Y B, et al. Preliminary study on prevention and treatment to grass carp hemorrhagia with interferon [J]. *Fisheries Science*, 2000, 19(4): 1—4 [贾方钧, 王铁辉, 张义兵等. 干扰素防治草鱼出血病的效果初探 [J]. 水产科学, 2000, 19(4): 1—4]
- [8] Zhang Y B, Wang T H, Li G Q, Jia F J, Yu X M. Induction and partial characterization of CAB cell (Blastula Embryonic Cell Line of Crucian Carp) interferon [J]. *Virologia Sinica*, 2000, 15: 163—169 [张义兵, 王铁辉, 李戈强等. 鲫囊胚细胞干扰素的诱导及部分特性 [J]. 中国病毒学. 2000, 15(2): 163—169]
- [9] Chen M R, Chen H X, Yi Y L. The establishment of a heteroploid line from crucian carp and its biological characteristics [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1985, 9(2): 121—130 [陈敏容, 陈宏溪, 易咏兰. 鲫鱼异倍体细胞系的建立及生物学特性 [J]. 水产学报, 1985, 9(2): 121—130]
- [10] Zuo W G, Qian H X, Xu Y F, et al. A cell line derived from the kidney of grass carp [J]. *Journal of Fisheries of China*. 1984, 10: 11—17 [左文功, 钱华鑫, 许映芳等. 草鱼肾脏组织细胞系 CLK 的建立 [J]. 淡水渔业, 1984, (2): 38—39]
- [11] Ke L H, Fang Q, Cai Y Q. Characteristics of a new isolation of hemorrhagic virus of grass carp [J]. *Acta Hydrobiology Sinica*. 1990, 14(2): 153—159 [柯丽华, 方勤, 蔡宜权. 一株新的草鱼出血病

- 毒分离物的特性[J]. 水生生物学报, 1990, **14**(2): 153—159]
- [12] Zhang Y B, Gui J F. Interferon inducible Mx proteins in fish [J]. *Virologica Sinica*, 2001, **16**(4): 291—298[张义兵, 桂建芳. 干扰素诱导的鱼类 Mx 蛋白[J]. 中国病毒学. 2001, **16**(4): 291—298]
- [13] Ellis A E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria [J]. *Developmental and comparative Immunology*. 2001, **25**: 827—839
- [14] Stark G R, Kerr I M, Williams B R, et al. How cells respond to interferons [J]. *Ann Biochem*. 1998, **67**: 227—264
- [15] Eaton W D. Antiviral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic: cytidylic acid [J]. *Dis Aquat Org*, 1990, **9**: 193—198
- [16] Pinto R M, Jofre J, Bosch A. Interferon like activity in sea bass affected by viral erythrocytic infection [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1993, **3**(2): 89—96
- [17] Trobridge G D, Leong J C. Characterization of a rainbow trout Mx gene [J]. *J interferon Cytokine Res*, 1995, **15**: 691—702
- [18] Trobridge G D, Chiou P P, Leong J C. Cloning of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Mx2 and Mx3 cDNAs and characterization of trout Mx protein expression in salmon cells [J]. *J virol*, 1997, **71**: 5304—5311
- [19] Robertsen B, Trobridge G D, Leong J. Molecular cloning double stranded RNA inducible Mx genes from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, **21**: 397—412
- [20] Lee J Y, Hirono I, Aoki T. Cloning and analysis of expression of Mx cDNA in Japanese flounder, *paralichthys olivaceus* [J]. *Dev Comp Immunol*, 2000, **24**(4): 407—415

CONSTRUCTION OF ANTIVIRAL SUBTRACTIVE cDNA LIBRARY OF CULTURED FISH CELLS

ZHANG Yi Bing, SHI Yao Hua and GUI Jian Fang

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

Abstract: The vertebrate interferon (IFN) system provides an initial line of defense against viral infection by inducing the synthesis of proteins that inhibit virus replication, but the normal cells do not, as a rule, contain or synthesize IFN. UV-inactivated GCHV is very effective for inducing blastulae embryonic cells of crucian carp (*Carassius auratus* L.) (CAB) to secrete interferon, which in turn act in both autocrine and paracrine fashion to induce the expressions of interferon responsive genes including antiviral genes, and finally contribute to form antiviral states in host cells. However, to date little was known about these proteins and genes. In order to analyze the change of gene expressions and isolate these related genes induced or activated by virus infection in CAB cells, an antiviral subtractive cDNA library of CAB was constructed by using Suppression Subtractive Hybridization (SSH) techniques. Typically, GCHV was purified and inactivated under UV irradiation for 5 min, and then CAB cells were treated with UV-inactivated GCHV. The mRNAs were extracted from virally infected CAB cells and mock-infected cells, respectively, and used for constructing subtractive cDNA library. In the present paper, the quality of cellular RNAs and adaptor ligation efficiency were analyzed, and two housekeeping genes, α -tubulin and β -actin, were used to estimate the efficiency of subtractive cDNA. In the antiviral subtractive cDNA library, the two housekeeping genes were subtracted very efficiently at appropriate 2^{15} and 2^7 folds, respectively, indicating that some differentially expressed genes including antiviral genes induced by viral infection were also enriched at the same folds. The subtractive cDNAs were ligated into the pGEM-T EASY vector (Promega) and following transfection into competent *E. coli* cells. 16 colonies were randomly selected from the plasmid library, and PCR analysis showed that the inserted cDNA fragments were between 0.2—2kb in length. The results suggested that the antiviral subtractive cDNA library is very successful, which will be essential for rapid isolation of fish antiviral genes and helpful for elucidation of molecular mechanism of fish innate defense against viral infections in the future.

Key words: Fish; Grass carp hemorrhage virus; Antiviral related gene; Induction; SSH