

# 镉诱导隆线溞(*Daphnia carinata*)生殖转化基因差减 cDNA 文库的构建与分析\*

罗文<sup>1</sup> 曾文涛<sup>1</sup> 王东方<sup>2</sup> 郑大恒<sup>1</sup> 韩继卫<sup>1</sup>

(1. 绍兴文理学院生命科学学院 绍兴 312000; 2. 新昌县来益生态农业发展有限公司 绍兴 312000)

**提要** 采用抑制性差减杂交方法进行了镉诱导下隆线溞生殖转化基因的抑制性差减 cDNA 文库的构建研究。结果显示,其差异表达基因被富集了  $2^{10}$  倍左右,PCR 鉴定发现 95% 的克隆均含有 200—800bp 的插入片段;测序获得的 252 个有效 EST 中,与细胞分裂相关的有 4 个,与细胞结构和功能相关的有 52 个,与细胞代谢相关的有 34 个,与信号传导相关的有 16 个,与细胞防御相关的有 10 个,与基因和蛋白质表达相关的有 76 个,未知功能的 EST 有 22 个,在 GenBank 中找不到任何同源序列的 EST 有 38 个。结果表明,构建的差异表达 cDNA 文库具有很强的差减效率,可较好地反映镉诱导下隆线溞差异表达的生殖转化基因信息。

**关键词** 隆线溞, 镉, 生殖, 抑制性差减杂交  
**中图分类号** Q75

隆线溞(*Daphnia carinata*)为一种常见的小型浮游动物,属节肢动物门(Arthropoda)、甲壳纲(Crustacea)、鳃足亚纲(Branchiopoda)、双甲目(Diplostraca)、枝角亚目(Cladocera)、溞科、溞属(蒋燮治等,1979)。隆线溞具有两种生殖方式:在外界条件比较适宜时,行孤雌生殖(无性生殖);而在环境条件恶化时,行两性生殖(有性生殖),这时种群中不仅有雌体,同时还出现雄体,二者随即交配产生后代。隆线溞两种生殖方式的交替,是其对外界环境的一种适应,孤雌生殖有助于其种群的迅速发展,而有性生殖形成的休眠卵(受精卵)能确保其渡过恶劣环境,以维持种群的存在与延续(Carvalho *et al*, 1983),这也是其在漫长的生物演化过程中形成的生态对策(Grebelnyi, 1996)。隆线溞等枝角类不但生殖方式特殊,还是一类重要的水生经济动物。它具有较高的蛋白质含量(占干重的 40%—60%),以及水产经济动物鱼、虾、蟹等生长发育所必需的氨基酸、维生素及钙质,是生产上十分理想的活体饵料,其产量与渔业生产密切相关(杨仕懋,1994)。

此外,隆线溞等枝角类还被视为水质变化的一类指示生物,具有重要的生态价值。众学者(Kleiven *et al*, 1992; Inner, 1997; 曹文清等,2001)研究发现枝角类生殖转化受外界环境因子诱导的影响较大,如温度、食物、光照周期等非生物因子和种群密度、代谢产物及捕食等生物因子的改变均会诱发两性雌体的产生,且能够增加子代幼溞中雄性的比例,表明枝角类的生殖转化与环境因子变化密切相关。近年来,随着工农业的快速发展,每年都有大量来自印染、农药、陶瓷、摄影、矿石开采、冶炼等行业的重金属镉(cadmium, Cd)排入水体,造成严重的水域环境污染(况琪军,1996)。镉不但能通过鱼、虾、贝等水生经济动物的食物链进行富集,影响其生长、生殖等生理活动(张义兵等,2003;徐晓倩等,2009);而且还能通过干扰隆线溞等枝角类的生殖调控方式影响其种群数量,进而影响水生经济动物的饵料组成(堵南山等,1983)。至于隆线溞的生殖转化如何受其自身基因的调控,环境因子在何种程度上起诱导作用,到底有哪些基因在枝角类生殖转化起着关键作用?迄今为止,

\* 浙江省自然科学基金项目(Y3110038)资助;浙江省科技厅公益项目(2011C22086)资助。罗文,博士,副教授, E-mail: luowen@usx.edu.cn

收稿日期:2012-04-24, 收修改稿日期:2012-06-29

人们对它们之间的内在关系和机理仍知之甚少。因此, 本文采用抑制性差减杂交技术(Suppression subtractive hybridization, SSH)对镉诱导下隆线溞生殖转化相关基因差减 cDNA 文库进行了构建, 以期为实际生产上调控其生殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

隆线溞(*Daphnia carinata*)取自华东师范大学生命科学学院实验室, 经种类鉴定后挑选活泼健壮的隆线溞孤雌生殖溞为试验亲体, 饲以枝角类培养液(泥土 10.0g、兔子粪便 1.5g 和青菜 2.0g 混合, 加入 1000ml 蒸馏水煮沸过滤), 每 2 天换水 1 次。培养温度( $20 \pm 0.5$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 在光照为白天 14h、夜间 10h, 光强 1200 lx 的光照培养箱中隔离培养(堵南山等, 1983)。定期选取多只含卵多且近孵化的孤雌生殖溞分别置于盛有 100ml 培养液的烧杯中单独培养, 以保证试验时的幼溞来源于同一孤雌溞。经多代孤雌生殖后, 选取刚孵化的幼溞进行试验。

实验分实验组和对照组, 实验组  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (分析纯)用万分之一分析天平准确称量, 用去离子水配制成有效离子浓度为  $32.00 \mu\text{g/L}$  的培养液; 对照组不添加  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。每组中放入刚孵化的幼溞 100 只, 并各设 3 组平行。实验共持续 72h, 之后取诱导前和诱导后的溞体进行抑制性差减 cDNA 文库的构建。

### 1.2 方法

根据抑制差减杂交原理, 应用 PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 分别以镉诱导前、后的隆线溞为 Driver 和 Tester 组进行差减杂交, 对差减后产物进行两轮抑制 PCR 反应, 将 PCR 产物克隆进 PMD18-T 载体中, 从而构建 cDNA 抑制差减文库。具体方法参见(苏建明等, 2007; 钟雪萍等, 2009), 略有改进。

**1.2.1 细胞总 RNA 的提取** 用 SV Total RNA Isolation System (Promega)提取镉诱导前、后的隆线溞的总 RNA, 电泳检测提取质量。进一步使用 Oligotex mRNA Kits 分别分离纯化样本的 mRNA。

**1.2.2 双链 cDNA 的合成** 按合成 SMART cDNA 的方法合成双链 cDNA。分别取纯化好的 Driver 和 Tester mRNA 各  $0.5 \mu\text{g}$  与 cDNA 合成引物和 SMART 寡聚核苷酸引物各  $1 \mu\text{l}$  混合, 补水到终体积为  $5 \mu\text{l}$ ,  $72^{\circ}\text{C}$  保温 2min 后, 置冰上速冷 2min, 然后在终体积  $10 \mu\text{l}$  的反应体系中, 加入  $5 \times$  第一链反应缓冲液  $2 \mu\text{l}$ 、

DTT ( $20 \text{mmol/L}$ )  $1 \mu\text{l}$ 、dNTP ( $10 \text{mmol/L}$ )  $1 \mu\text{l}$ 、PowerScript 反转录酶  $1 \mu\text{l}$ ,  $42^{\circ}\text{C}$  保温 1h 合成第一链 cDNA。取  $2 \mu\text{l}$  第一链 cDNA 于  $100 \mu\text{l}$  体系中, 加入 dNTP  $2 \mu\text{l}$ 、PCR 引物  $4 \mu\text{l}$  和  $2 \mu\text{l}$   $50 \times$  Advantage cDNA Polymerase Mix, 进行 LD-PCR 进行第二链合成。PCR 反应参数为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 1min, 然后  $95^{\circ}\text{C}$  5s,  $65^{\circ}\text{C}$  5s,  $68^{\circ}\text{C}$  6min, 17 个循环。

**1.2.3 抑制性差减杂交** 用 *Rsa* 充分酶切镉诱导前隆线溞的双链 cDNA 后完成 Driver cDNA 的制备。镉诱导后隆线溞的双链 cDNA 用 *Rsa* 酶切后, 分成两份, 分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 连接后即制成 Tester1-cDNA 和 Tester2-cDNA。Tester1-cDNA 和 Tester2-cDNA 分别与 Driver cDNA 进行第一次杂交, 混合两种杂交产物, 再与新变性的 Driver cDNA 进行第二次杂交。杂交产物以引物 primer1 进行第一次 PCR 扩增, 第一次 PCR 产物再用引物 Nested primer1 和 2R 进行第二次 PCR 扩增, 使差异表达基因得到指数扩增。进行差减杂交的同时, 也制备未差减 cDNA 以检测差减文库的差减效率。

**1.2.4 接头连接效率的检测** 接头连接效率的检测以欧洲龙虾(*Homarus gammarus*)的  $\alpha$ -actin 特异上游引物和下游引物为一个组合以及试剂盒提供的接头引物 PCR primer1 (5'-CTAATACGACTCACTATAG GGC-3')和  $\beta$ -actin 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:  $75^{\circ}\text{C}$  5min,  $94^{\circ}\text{C}$  5min, 然后  $94^{\circ}\text{C}$  30s,  $50^{\circ}\text{C}$  30s,  $72^{\circ}\text{C}$  1min 扩增 30 个循环。*Homarus gammarus* 的  $\alpha$ -actin 基因的上游引物和下游引物序列分别为: 5' GACGATATGG AAAAGATCTGGCAT 3'和 5' GTCCACAGGAAGTG CTTCTAAAAT 3'。

**1.2.5 镉诱导反应基因差减 cDNA 文库的构建** 将获得的 SSH 产物插入 pGEM2T 载体(Promega), 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 用氨苄青霉素和蓝/白斑法筛选阳性克隆。

**1.2.6 差减文库 cDNA 片段大小检测、测序及序列比较分析** 随机挑选白色菌落,  $37^{\circ}\text{C}$  培养 4h。取  $0.5 \mu\text{l}$  菌液, 用差减试剂盒提供的引物 Nested 1 和 Nested 2R 检测插入片段大小。PCR 扩增参数为:  $94^{\circ}\text{C}$  15s,  $65^{\circ}\text{C}$  30s,  $72^{\circ}\text{C}$  2min 共 30 个循环。随机挑选片段大小在 200bp 以上的克隆 300 个进行测序。将所测 ESTs 序列在 NCBI 网站进行在线 BLAST 分析。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 的电泳鉴定

提取镉诱导前、后的隆线蚤总 RNA 经紫外分光光度检测其  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8—2.0 之间, 电泳检测可见在 28S、18S 位置有 2 条完整、明显的带(图 1), 表明 RNA 纯度较高, 完整性好, 符合建库要求。

### 2.2 Tester cDNA 的接头连接效率检测

以 Tester 1-cDNA 和 Tester 2-cDNA 为模板进行接头连接效率检测。图 2 中 1、3 泳道为  $\beta$ -actin 引物和 adaptor 1 引物 PCR 扩增产物, 2、4 泳道为  $\beta$ -actin 上下游引物引物 PCR 扩增产物。结果可见 1、3 泳道产物明显大于 2、4 泳道, 表明 dscDNA 与接头的连接是成功的。

### 2.3 差减文库的建立

将制备的 Driver cDNA 和 Tester cDNA 分别经 2 轮杂交和 2 轮 PCR 后即可构建镉诱导下的隆线蚤生殖转化差减 cDNA 文库。凝胶电泳显示(图 3), 2 轮 PCR 扩增后的杂交产物为一弥散的 cDNA 群体, 杂交产物主要集中在 200—800bp 之间, 内含有几条较为清晰的条带, 表明已经成功构建了其差减 cDNA 文库。

### 2.4 差减 cDNA 文库差减效率检测

由图 4 可见, 采用欧洲龙虾  $\beta$ -actin 特异性引物分别扩增未差减和差减后的第 2 次 PCR 产物后, 未经差减杂交的 cDNA 在 18 循环处即可见产物条带, 28 次循环后条带非常明显; 而经过差减杂交的 cDNA, 则延迟 10 个循环后方可见 PCR 产物条带, 差异表达的基因均被富集了  $2^{10}$  多倍, 表现出较高的差减杂交效率(图 4)。

### 2.5 差减文库 cDNA 片段的 PCR 筛选

将差减 cDNA 片段连接入 pGEM2T 载体, 得到含

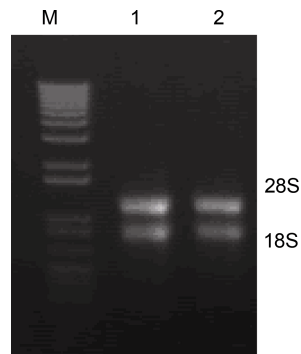


图 1 隆线蚤总 RNA 提取  
Fig.1 Total RNA extracted from *D. carinata*  
注: M: DNA marker; 1: 镉诱导前的隆线蚤总 RNA; 2: 镉诱导后的隆线蚤总 RNA

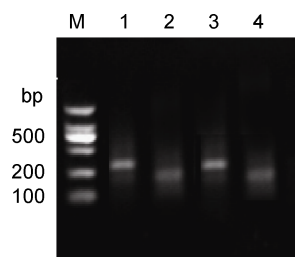


图 2 Tester cDNA 接头连接效率检测  
Fig.2 Detection of the adaptor ligation efficiency of tester cDNA  
注: M: DNA marker; 1、3:  $\beta$ -actin 引物和 adaptor 1 引物 PCR 扩增产物; 2、4:  $\beta$ -actin 上、下游引物 PCR 扩增产物

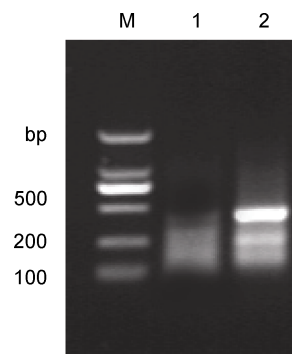


图 3 已差减和未经差减 cDNA 的第 2 次 PCR 产物  
Fig.3 The 2<sup>nd</sup> PCR products of subtracted and unsubtracted cDNA  
注: M: DNA marker; 1: 以有差减 cDNA 为模板; 2: 以未差减 cDNA 为模板

近 3000 个克隆的质粒文库, 随机取 300 个克隆进行 PCR 筛选。发现其插入片段在 200—800bp 之间, 图 5 为随机挑取的 13 个克隆的 PCR 结果。

### 2.6 差减 cDNA EST 序列统计与分析

将随机抽取的 300 个克隆送上海生工公司进行测序, 测序结果在 NCBI 网站上进行 Blast 分析, 获得一系列基因信息。其中与细胞分裂相关的 EST 有 4 个, 占总数的 1.33%; 与细胞结构和功能相关的 EST 有 52 个, 占总数的 17.33%; 与细胞代谢相关的 EST 有 34 个, 占总数的 11.33%; 与信号传导相关的

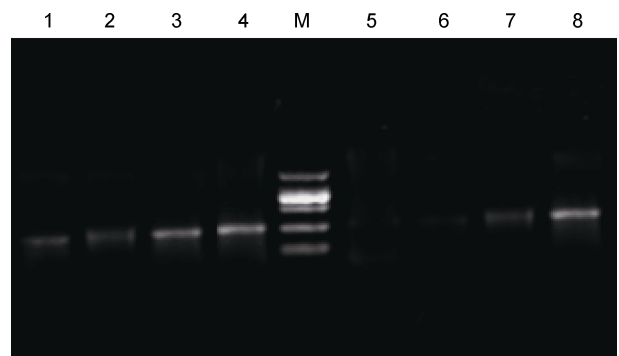


图 4 cDNA 文库的差减杂交效率的检测  
Fig.4 Subtract efficiency of cDNA library by detection  
注: M: DNA marker; 1—4: 未经差减的 cDNA 经 18、23、28 和 33 循环的 PCR 产物; 5—8: 经差减的 cDNA 经 18、23、28 和 33 循环的 PCR 产物

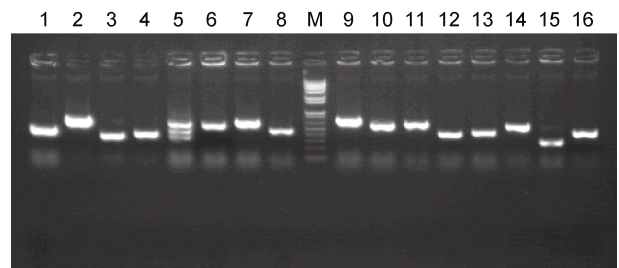


图 5 差减 cDNA 文库中插入 cDNA 片段大小的鉴定  
Fig.5 Identification of the inserted cDNA fragments in subtractive cDNA library  
注: M: DL 2000 DNA marker; 1—16: 从差减文库中随机挑取的 16 个克隆

EST 有 16 个, 占总数的 5.33%; 与细胞防御相关的 EST 有 10 个, 占总数的 3.33%; 与基因和蛋白质表达相关的 EST 有 76 个, 占总数的 25.33%; 未知功能的 EST 有 22 个, 占总数的 7.33%; 在 GenBank 中找不到任何同源序列的 EST 有 38 个, 占总数的 12.67%; 检测失败的有 22 个, 占总数的 7.33%; 重叠的有 26 个, 占总数的 8.67%(图 6)。

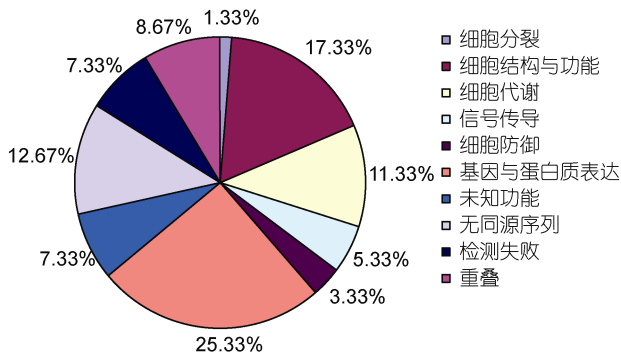


图 6 差减文库 ESTs 的分类

Fig.6 Classification of the ESTs according to the subtractive library

### 3 讨论

#### 3.1 差减 cDNA 文库的构建效果

抑制性差减杂交是寻找差异表达基因的有效方法之一, 在构建差减 cDNA 文库的过程中, mRNA 的质量、接头连接效率和差减效率高低是决定差减 cDNA 文库质量的关键(张义兵等, 2003)。本实验构建了隆线蚤镉诱导下生殖转化的抑制性差减 cDNA 文库, 经检验, mRNA 的质量、接头连接效率均较理想; 差异表达基因被富集了  $2^{10}$  倍左右, 证明构建的 cDNA 差减文库具有很强的差减效率。

#### 3.2 镉对隆线蚤生理代谢及生殖的影响

重金属镉是一类具有潜在危害的重要污染物, 具有隐蔽性、长期性和不可逆性等特点, 在外环境中可通过一系列迁移、转化, 并经过食物链的积累和放大作用, 对人类产生巨大的毒害。隆线蚤作为水生生态系统食物链中重要的环节, 水体中重金属镉含量的变化均能通过它的生殖现象表现出来。邵蕾等(2010)研究了镉对三种水蚤繁殖能力的影响, 发现低浓度的镉(0.032mg/L)对隆线蚤每胎的产蚤数有促进的作用, 高浓度的镉(0.1mg/L)则明显降低且死亡率增加。徐晓倩等(2009)发现镉对隆线蚤具有一定的毒性效应, 在低浓度下隆线蚤体长有所增加; 在较高浓度下则表现出明显的下降趋势; 镉能使其怀卵日提前, 并有

早熟趋势; 怀卵数在低浓度下变化不大, 高浓度下急剧减少, 但孵化率受影响不明显。如果有多种重金属存在时, 镉的毒性作用在一定条件下可被其它重金属缓解, 张融等(2008)曾发现镉和锌对大型溞(*Daphnia magna*)的联合作用表现为拮抗。从本研究所构建的差减文库来看, 镉诱导后与隆线蚤生理代谢相关的基因表达发生了巨大的变化。差减基因主要集中在与细胞分裂(占 1.33%)、细胞结构和功能(占 17.33%)、细胞代谢(占 11.33%)、信号传导(占 5.33%)、细胞防御(占 3.33%)方面。由此可见, 重金属对枝角类生殖的影响往往是通过代谢起作用的, 隆线蚤对较低浓度的重金属有一定的耐受性, 但一旦超过其耐受范围就会诱导大量代谢相关基因的表达, 导致物质、能量在生殖中的分配与积累, 从而影响正常的生殖。更多表现在代谢率的下降, 从而促使产生雄性的个体, 影响种群的性别比。Hobaek 等(1990)和 Kleiven 等(1992)研究认为枝角类对自身代谢产物累积敏感, 重金属诱导产生的自身代谢物会对其生殖产生较大的抑制作用, 甚至单只培养的溞体, 其代谢产物也会降低生殖率。

#### 3.3 镉对隆线蚤生殖转化相关基因和蛋白的影响

随着研究的不断深入, 越来越多的学者认为枝角类生殖转化本质上还受自身内部生殖转化相关基因的调控(Yampolsky, 1992; Lynch *et al*, 1994; 曹文清等, 1999; 王金秋等, 2000), 重金属等环境因子仅在一定程度上起诱导作用。为了进一步研究生殖相关的基因, Watanabe 等(2005)构建了大型溞的 cDNA 文库, 并挑取其中的克隆进行 EST 的测定和分析。依靠 ESTs 的信息, Kato 等(2008)从大型溞中成功克隆了与性别分化相关的重要基因 *dsx/mab-3 domain*。随后, Xu 等(2009)构建了隆线蚤雌溞的 cDNA 文库, 并与蚤状溞的 cDNA 文库(Eads *et al*, 2007)进行了比对, 初步获得 1495 条单一序列(465 条 contigs 和 1030 条 singletons)。通过比对, 总共注释了 959 个(64%)基因, 其中与生殖和胚胎发育相关的基因共鉴定到 57 个基因, VTN 和 VTG 基因所占比例较高; 并发现了生殖特异性表达的基因如 *ubulin alpha chain*; 另外检测到一些化学感应基因(CSP)和热激蛋白(HSP)基因, 推测这些密切感受环境变化的基因在孤雌生殖中起到重要的作用。除此之外, 还有一引起功能蛋白也会对生殖产生影响, Zhang 等(2006)提取隆线蚤孤雌溞和两性雌溞的可溶性蛋白进行双向电泳和质谱鉴定, 发现隆线蚤从孤雌生殖转化为两性生殖后有 18 个蛋

白质点呈现显著变化, 其中 14 个点表达量明显下降, 4 个点表达量显著升高。取 4 个表达量显著上升的蛋白质点进行质谱分析, 得到两个蛋白质点的测定结果。其中一类酸性脱氢酶(2I234), 它在动物生长发育的各个阶段大量表达, 这类蛋白质在隆线溞生殖转化过程中表达量变化尤为显著。从本研究所构建的差减文库来看, 与生殖基因和蛋白质表达相关的 EST 有 76 个, 占总数的 25.33%; 未知功能的 EST 有 22 个, 占总数的 7.33%; 在 GenBank 中找不到任何同源序列的 EST 有 38 个, 占总数的 12.67%。由此可见, 镉等重金属诱导下此类相关基因和蛋白的表达也较活跃。但具体是哪些基因或蛋白起关键作用, 还需在此差减文库的基础上进一步深入分析。

近年来, 随着我国水产养殖业的蓬勃兴起及苗种生产的不断发展, 对隆线溞等枝角类的需求量越来越大, 并需在不同季节保障充足供给。由于至今人们对隆线溞等枝角类的生殖转化机制还不了解, 致使其规模化人工培养仍存在一定的困难。因此, 深入研究枝角类的生殖生物学, 弄清其生殖转化的规律和机理, 不仅对水生经济动物鱼、虾、蟹等的规模化养殖和育苗, 保护水生生态具有重要的现实意义; 而且对研究动物生殖发育的起源和转化模式, 实现动物生殖发育的人为调控也具有重要的理论意义。

### 参 考 文 献

- 王金秋, 张佳忆, 黄 博, 2000. 生态因子的波动对多刺裸腹溞雄体发生的影响. 应用生态学报, 11(1): 135—137
- 苏建明, 陈 韬, 肖调义等, 2007. 草鱼肠道组织差异表达基因消减文库的构建. 湖南农业大学学报(自然科学版), 33(6): 718—722
- 杨仕懋, 1994. 鱼类摄饵促进物质与先进养鱼业. 水产学报, 18(1): 80—83
- 况琪军, 1996. 重金属对藻类的致毒效应. 水生生物学报, 20(3): 277—283
- 张 融, 范文宏, 唐 戈等, 2008. 重金属 Cd 和 Zn 对水生浮游动物大型溞(*Daphnia magna*)联合毒性的研究初探. 内蒙古大学学报, 39(6): 704—709
- 张义兵, 石耀华, 桂建芳, 2003. 鱼类培养细胞抗病毒基因差减 cDNA 文库的构建. 水生生物学报, 27: 113—118
- 邵 蕾, 黄建国, 袁 玲等, 2010. 重金属镉对三种水溞繁殖能力的影响. 西南大学学报(自然科学版), 32(3): 103—106
- 钟雪萍, 王 丹, 张义兵等, 2009. 鲫鱼低氧相关基因差减 cDNA 文库的构建与分析. 水生生物学, 33(1): 113—118
- 徐晓倩, 翁显龙, 赵云龙等, 2009. 镉对隆线溞的毒性效应及其对肠壁细胞超微结构的影响. 复旦学报(自然科学版), 48(3): 375—380
- 堵南山, 赖 伟, 邓雪怀等, 1983. 隆线溞(*Daphnia carinata* King)生长与生殖力. 华东师范大学学报(自然科学版), 1: 85—91
- 曹文清, 林元烧, 郭东晖, 2001. 若干生态因子对蒙古裸腹溞生殖方式转变效应的实验. 台湾海峡, 20(增刊): 190—195
- 曹文清, 林元烧, 郭东晖等, 1999. 蒙古裸腹溞染色体组型研究. 台湾海峡, 18(1): 71—75
- 蒋燮治, 堵南山, 1979. 中国动物志: 节肢动物门甲壳纲淡水枝角类. 北京: 科学出版社, 1—297
- Carvalho G R, Hughes R N, 1983. The effect of food availability, female culture-density and photoperiod on ehippia production in *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera). Freshwater Biology, 13: 37—46
- Eads B D, Colbourne J K, Bohuski E *et al*, 2007. ProWling sex-biased gene expression during parthenogenetic reproduction in *Daphnia pulex*. Genomics, 8: 464—467
- Grebelyni S D, 1996. Influence of parthenogenetic reproduction on the genotypic constitution and evolutionary success of population and species. Hydrobiologia, 320(1—3): 55—61
- Hobaek A , Larsson P, 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology, 71(6): 2255—2268
- Inner D J, 1997. Sexual reproduction of *Daphnia pulux* in a temporary habitat. Oecology, 111(1): 53—60
- Kato Y, Kobayashi K, Oda S *et al*, 2008. Molecular cloning and sexually dimorphic expression of DM-domain genes in *Daphnia magna*. Genomics, 91: 94—101
- Kleiven O T, Larsson P, Hobaek A, 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos, 65(2): 197—206
- Lynch M, Deng H W, 1994. Genetic slippage in response to sex. American Naturalist, 144(2): 242—261
- Watanabe H, Tatarazako N, Oda S *et al*, 2005. Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. Genome, 48(4): 60—69
- Xu X Q, Song S H , Wang Q *et al*, 2009. Analysis and comparison of a set of expressed sequence tags of the parthenogenetic water Xea *Daphnia carinata*. Mol Genet Genomics, 282: 197—203
- Yampolsky L Y, 1992. Genetic variation in the sexual reproduction rate within a population of a cyclic parthenogen *Daphnia magna*. Evolution, 46(3): 833—837
- Zhang M F, Zhao Y L, Zeng C *et al*, 2006. Differential protein expression between parthenogenetic and sexual female of *Daphnia (Ctenodaphnia) carinata*. Acta Zoologica Sinica, 52(5): 916—923

## CONSTRUCTION AND ANALYSIS OF SUBTRACTED cDNA LIBRARY BY SUPPRESSION SUBTRACTIVE HYBRIDIZATION FROM THE REPRODUCTIVE CONVERSION GENES OF *DAPHNIA CARINATA* INDUCED BY CADMIUM

LUO Wen<sup>1</sup>, ZENG Wen-Tao<sup>1</sup>, WANG Dong-Fang<sup>2</sup>, ZHENG Da-Heng<sup>1</sup>, HAN Ji-Wei<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Shaoxing University, Shaoxing, 312000; 2. Xinchang County Laiyi Ecological Agriculture Development Co., Ltd., Shaoxing, 312000)

**Abstract** Suppression subtractive hybridization (SSH) was used to construct the cDNA subtractive library from the reproductive conversion genes of *Daphnia carinata* induced by cadmium in this paper. The result showed that differentially expressed genes were enriched  $2^{10}$  times, 95% cloned sequences contained 200—800bp insertions in randomly selected positive clones, which were identified by PCR. 252 effective ESTs were obtained by sequencing, relevant to 4 belong to cell division genes, 52 belong to cellular structure and movement genes, 34 belong to metabolism genes, 16 belong to signal transduction genes, 10 belong to cell immune action genes, 76 belong to gene and protein expression associates genes and 22 belong to unknown functions; in addition, there are 38 no similar sequences in GenBank. The results suggested that the cDNA library had strong subtractive efficiency, SSH method was used to construct cDNA subtractive library could well reflect the differentiation gene information of the reproductive conversion of *D. carinata* induced by cadmium.

**Key words** *Daphnia carinata*, Cadmium, Reproduction, Suppression subtractive hybridization