

197-202

第28卷 第6期
2000年12月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 6
Dec. 2000

[文章编号] 1000-2782(2000)06-0197-06

mRNA 差异显示技术及其在植物生理研究中的应用

王西平¹, 刘振中¹, 秦宝福², 赵明德¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院; 2 生命科学学院, 陕西 杨凌 西农校区 712100)

[摘要] 简述了 mRNA 差异显示技术的基本原理及其在基因表达差异、基因的鉴定与克隆、激素调控机理、抗逆性机理等方面的应用, 并对其在植物生理研究中存在的问题与改进的方法做了介绍。

[关键词] mRNA 差异显示; 基因表达差异; 基因克隆

植物生理

[中图分类号] [Q812] **[文献标识码]** A

据估计, 高等植物一般具有 10^5 个不同的基因, 在单个细胞或单个个体中仅有约 15% 的基因得到表达, 产生约 15 000 种 mRNA, 正是由于基因的选择性表达, 使得生物的各种生命活动得以实现, 因此, 研究基因的选择性表达, 从分子水平阐明生物整个生命过程, 具有非常重要的意义。转录水平上研究基因表达差异的常用方法是减法杂交法 (Subtractive hybridization), 可以有效的富集目的基因的表达片段, 但这种方法耗时费力, 重复性差, 需要大量的 RNA, 试验步骤繁琐以及难以检测低丰度的 mRNA 等一系列不足。Liang 和 Pardee 等^[1] 根据高等生物成熟的 mRNA 带有多聚 A 的特性, 建立了 mRNA 差异显示技术 (mRNA differential display reverse transcription-PCR, DDRT-PCR)。由于该技术具有 DNA 用量少, 灵敏度高, 操作简便快速和可分析低丰度 mRNA 等特点^[2], 因而在研究植物基因表达差异、克隆新基因以及探讨抗病机制等方面得到了广泛的应用。

1 mRNA 差异显示技术的基本原理

mRNA 差异显示技术是一种比较不同细胞系、不同组织间, 或同一细胞系、同一组织不同条件下基因表达差异的方法, 其基本原理是: 在 mRNA 3' 端的 polyA 尾前面的 2 个碱基除了倒二位碱基为 A 外, 只有 12 种组合, 与此相对应, 人工合成的 Oligo-dT 后面接上两个碱基 (如 5'-T₁₁₋₁₂MN3', M=G、C 或 A; N=A、G、C 或 T)。以此引物进行反转录反应, 然后用与反转录相同的锚定引物和由 10 个碱基组成的随机引物, 对生成的 cDNA 进行低温退火的 PCR 扩增, 通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳在相邻泳道上平行显示扩增结果, 电泳谱带使两类细胞群体的基因表达差异情况一清二楚。然后, 从胶上切下这些 cDNA 片段, 进行克隆分析或用作探针, 可由 cDNA 库或基因组 DNA 库中筛选到全长的

[收稿日期] 1999-12-07

[作者简介] 王西平 (1968-), 男, 讲师, 在职博士生。

cDNA 或 DNA 克隆。mRNA 差异显示技术的技术路线见图 1。

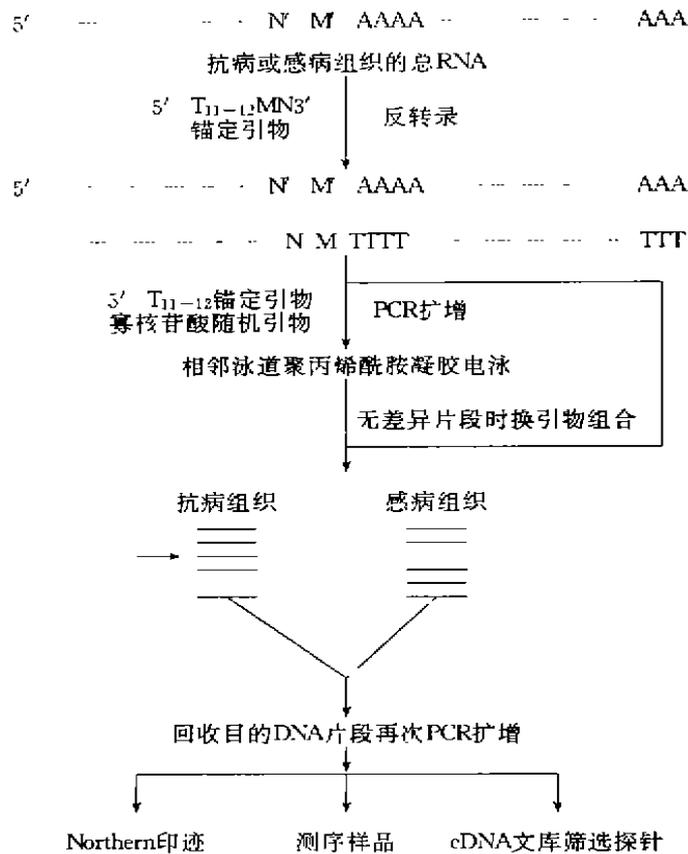


图1 mRNA差异显示技术工作路线图

2 mRNA 差异显示技术在植物生理研究中的应用

2.1 基因表达差异

由于 mRNA 差异显示技术有快速、简便、灵敏等特点,因而可以了解植物不同发育阶段或不同环境下细胞之间基因表达的差异。张驰等^[3]利用 mRNA 差异显示技术比较了水稻 77-170 与其耐盐突变体 M-20 在盐胁迫下基因表达的差异,克隆了 13 个分别在 77-170 或 M-20 中盐诱导蛋白的 cDNA 片段,这些克隆的获得为进一步研究水稻盐诱导蛋白的表达特性打下了基础。崔凯荣等^[4]利用 mRNA 差异显示技术分析枸杞体细胞胚发生早期基因的差异表达,得到了 3 个在体细胞胚发生早期组织中基因特异表达的片段,为了研究非乙烯敏感植物的成熟机理,以未成熟和成熟的非乙烯敏感草莓果实为材料,应用差异显示技术用 3 对引物组合得到了 5 个仅出现在成熟阶段的差异片段,其中 3 个分别与可能编码拟南芥,40S 核糖体 s12 蛋白的 cDNA 克隆 YAP267T7、豌豆等的膜联蛋白以及许多植物的查耳酮合酶基因有较高同源性,研究这些基因表达产物的生物学功能将为从分子水平揭示果实成熟本质提供重要线索^[5]。王光清等^[6]采用 MADS 盒基因家族功能区保守

序列 PCR 引物,将水稻“珍汕 97B”悬浮细胞、愈伤组织、分化愈伤组织和再生试管苗等不同形态发生的组织的 mRNA 反转录后选择性放大,经测序胶分离鉴定出 1 组差异表达的 cDNA,对命名为 RM1 cDNA 的 5'端序列测定表明, RM1 与典型的 MADS 基因——拟南芥 *agamous* 蛋白保守区一级结构同源性达 63%,模拟二级结构相似性显著,初步确认 RM1 属于 MADS 基因家族成员。

此外,运用 mRNA 差异显示技术研究基因表达差异,在玉米^[7]、家蚕^[8]、水稻^[9]、豌豆^[10]、马铃薯^[11]、拟南芥^[5]等都有报道。

2.2 基因的鉴定与克隆

分析基因表达差异,寻找分子标记的目的是为了克隆基因,研究其对植物生长和发育的影响。张景凤等^[12]利用 mRNA 差异显示技术扩增并克隆了 SMV-zk 基因组中全部蛋白质编码区的 cDNA,通过对 HC-PRO、NIB 和 CP 编码区进行序列测定与分析,发现与 SMV-G2 高度同源,从而在分子水平证明中国大豆作物中存在 SMV-G2 类似株系,将 SMV-zkcDNA 克隆于细菌表达载体,获得并提纯了 6 种 cDNA 的表达产物,这为进一步研究 SMV 基因组的功能奠定了基础。Sharma 等^[13]分析了拟南芥对臭氧的反应。拟南芥用臭氧处理后,在根和成熟花中,臭氧诱导的转录物 AtOZ1mRNA 含量极高,是叶的 3~5 倍。序列分析证明,AtOZ1 编码 1 个 Mr8600 蛋白多肽,其序列与已知的蛋白质序列基本一致,充分表明 mRNA 差异显示技术是克隆基因的有效方法。Fischer 等^[14]采用改进的 mRNA 差异显示技术(RC4D),从玉米花序中分离出 6 个在雌雄花序中差异表达的 MAD-box 基因;从小麦和拟南芥^[14]中分别分离出 HSP 家族基因。Knaap 等^[15]克隆了水稻的赤霉素调控基因,利用赤霉素处理水稻,一个诱导,一个不诱导,发现二者存在差异显示时,mRNA 表达量相差 10 倍,因而很容易克隆 1 个赤霉素调控基因。

2.3 抗逆性机理的研究

植物生长、发育与环境条件密不可分,在长期的自然选择中,两者间形成了一种动态平衡,而这种平衡是靠植物体内相关基因的选择性表达来调节的,如抗病虫基因,盐胁迫、高低温胁迫等抗性基因^[16]。因而,研究抗逆性机理对于提高植物的抗逆性很有必要。

为了探讨橡胶树“死皮病”的分子机理,黄贵修^[17]利用 mRNA 差异显示技术比较了巴西橡胶树不同品系 RRIM600,13-28,1-20,PB5/51×PR107,RRIM×PR107 10 组共 20 株健康树和死皮树胶乳、树皮形成层基因表达的差异,发现在健康树中表达而在死皮树中未表达的几条差异带,命名为 HbR-61,HbR-62,HbR-63,HbR-64,对 HbR-61 进行回收和克隆,经过 Northern 杂交证实,HbR-61 在健康树胶乳中表达活跃,而在死皮树胶乳中表达受到抑制。Genebank 检索表明此差异片段为新的 cDNA 序列。Jacobs^[18]用 mRNA 差异显示技术分析了马铃薯的抗冷机理,把一部分马铃薯进行冷处理,另一部分不处理,比较两者 mRNA 的表达情况,发现冷处理的马铃薯增加了一些 mRNA 片段,表明有一些低温诱导的 mRNA 片段出现,经过 Northern 杂交分析,这些低温诱导的 mRNA 片段都是组成性表达。这说明植物在遇到低温时,会产生一些应急反应,以抵挡低温危害。

2.4 探索激素调控机理

激素在植物的生长发育过程中,起着非常重要的作用。因而研究其调控机理有重要意义。Knaap 等^[15]以深水水稻为材料,分别用水和赤霉素处理水稻植株的茎部节段,用

mRNA 差异显示技术研究了赤霉素诱导基因表达的效果。引物组合 T₁₂MG 和 OPA-O4 扩增出了 1 条命名为 9B 的产物,引物组合 T₁₃MG 和 OPA-07 扩增出了 1 条命名为 D 的产物。用这 2 种产物作探针,对 GA₃ 处理 1~24 h 材料的 mRNA 作 Northern 杂交,发现 D 探针的杂交信号在所有处理中没有变化,而 9B 探针杂交信号从处理 3 h 开始逐渐增强,直到处理 8 h 达到高峰且保持到 24 h。对 9B 和 D 序列对应的氨基酸分析,发现 9B 与水稻组氨酸 H₂ 编码区一致,而 D 有 63% 的氨基酸与菠菜叶绿体内部包装蛋白 E₃₇ 一致,比较用 9B 探针对不同处理 Northern 杂交信号与 DNA 在不同处理的合成量间的关系,显示了高度的相关性,说明在细胞周期这个组氨酸是受到转录水平调控的,它可作为深水水稻 GA₃ 诱导细胞分化的标记。Chen 等^[19]用赤霉素处理水稻幼苗,发现处理过的幼苗中 mRNA 有特异的差异带。克隆该条带,发现该条带影响基因调控过程中的某些蛋白。瞬时表达分析证明,该序列位于启动子转录起始位点上游 231~159 碱基位置,另外,还发现 UCB gene 可促进 α-淀粉酶基因表达,从而调节水稻幼苗发育。

此外,mRNA 差异显示技术还被用于分子标记^[5]、种属特异性鉴定^[8]、基因突变、研究次生代谢途径^[20]等各个方面。

3 mRNA 差异显示技术存在的问题及改进方法

3.1 mRNA 差异显示技术存在的问题

mRNA 差异显示技术虽具有操作简便、快速、灵敏、能同时进行两组或两组以上样品的分析、比较等特点,但在某些方面也存在着一些尚待解决的问题。一是“假阳性(false positive)”很高,可达 70%^[21],使探针筛选十分费时,增加了后续工作的难度。二是由于 PCR 自身对反应条件的敏感性,mRNA 差异显示技术重复性较差。三是扩增片段小,不能代表真正差异表达的基因。四是由于只能扩增靠近 Poly A mRNA 3' 端不大于 600 bp 的区域,使上游的差异表达信息量得不到检测。

3.2 mRNA 差异显示技术的改进

(1)提取高质量的总 RNA。mRNA 差异显示技术以组织或细胞的总 RNA 为模板,模板质量的高低直接关系到 mRNA 差异显示技术的成败。在提取 RNA 时,首先要保证 RNA 的完整性,不能被 RNase 降解;其次不能受 DNA 污染,否则必须用 DNase 去除。

(2)引物的改进提高了 mRNA 差异显示技术的重复性。如有的在 3' 端锚定引物和 5' 端各加上 10 个碱基,带上 *EcoR* I 双酶切位点,可显著提高重复性。

(3)降低 dNTPs 浓度。dNTPs 浓度过高,降低扩增的特异性,也不利于同位素的掺入。降低 dNTPs 的浓度,可以提高序列胶的分辨率。

(4)选择适宜的 PCR 退火温度是决定 PCR 扩增特异性的关键因素之一。从 Khushbeer 等^[22]、Mou 等^[23]和 Chapman 等^[24]的研究结果来看,在锚定引物中,有 1 个或 2 个 G,其扩增效率比 C 和 A 高。

(5)使用合适的 DNA 聚合酶。差异显示技术对反转录酶和 DNA 聚合酶要求比较严格,因此,在预备试验中,可以用几个不同公司生产的 DNA 聚合酶进行比较,筛选合适的 DNA 聚合酶。

(6)采用 mRNA 差异显示技术衍生的一系列技术,在引物设计、Northern 杂交和凝

胶测序等方面都得到完善和发展。如 cDNA 末端快速扩增法(Rapid amplification of cDNA ends, RACE)^[25]、基因表达连续分析法(Serial analysis cDNA of gene expression, SAGE)^[25]、RC4D(RFLP—Coupled domain directed differential display)^[14]、cDNA 代表性差异分析(Representational difference analysis of cDNA)^[26]、抑制消除杂交法(Suppression subtractive hybridization, SSH)^[25]、cDNA-AFLP 法^[27]等。

4 结 语

自 1992 年 Liang 首创 mRNA 差异显示技术以来,mRNA 差异显示技术仅仅经过短短 6 年的时间,便在基因表达差异、基因的鉴定与分离、激素调控、抗逆性机制、分子标记和种属特异性鉴定等方面得到了广泛的应用。尤其是近几年,mRNA 差异显示试剂盒(kit)的商品化,为 mRNA 差异显示提供了成套试剂,高分辨率的 DNA 测序仪的研制成功,为 mRNA 差异显示提供了强有力的研究工具。随着 mRNA 差异显示在植物研究上的不断深入,它将对基因克隆、杂种优势机理的揭示、抗逆性机制的研究、激素调控的分子机理、生物体对外因刺激的反应等方面发挥越来越大的作用。

[参考文献]

- [1] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. *Sci*, 1992, 257: 967—970.
- [2] Liang P, Arerboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization[J]. *Nucleic Acids Res*, 1993, 21(14): 3269—3275.
- [3] 张 驰, 陈受宜. 利用 DDRT-PCR 技术分析在盐胁迫下水稻耐盐突变体中特异表达的基因[J]. *中国科学(B 辑)*, 1995, 25(8): 840—847.
- [4] 崔凯荣, 邢更生, 秦 琳, 等. 利用 mRNA 差别显示技术分析枸杞体细胞胚发生早期基因的差别表达[J]. *遗传*, 1998, 20(5): 16—19.
- [5] 陈中健, 王金发. 差异显示技术及其进展[J]. *生物工程进展*, 1998, 18(5): 21—25.
- [6] 王光清, 胡建广, 赵相山, 等. 水稻愈伤组织形态发生中的 MAOS 盒基因的差异表达[J]. *植物学报*, 1997, 39(1): 1035—1041.
- [7] 程宁辉, 杨金水, 高燕萍, 等. 玉米杂种一代与亲本基因表达差异的初步研究[J]. *科学通报*, 1996, 41(5): 451—454.
- [8] 刘振义, 屈贤铭. 用差异显示技术寻找家蚕诱导前后特异表达的基因[J]. *生物工程学报*, 1999, 15(1): 59—63.
- [9] 张立平, 吴 平, 祝全明. 利用 DDRT-PCR 技术分析水稻铝诱导基因的表达差异[J]. *中国农业科学*, 1997, 30(5): 71—74.
- [10] Brigham L A, Woo H H, Nicoll S M. Differential expression of proteins and mRNAs from border cells and root tips of pea[J]. *Plant Physical*, 1995, 109: 457—463.
- [11] Bachem C W B, Hoeven van der R S, Brujin S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant Jour*, 1996, 9(5): 745—753.
- [12] 张景凤, 赵 慧, 桂晋刚, 等. 利用 RT-PCR、DNA 序列分析及原核基因表达对我国大豆花叶病毒进行分子鉴定 [J]. *植物学报*, 1999, 41(9): 932—935.
- [13] Sharma Y K, Davis K R. Isolation of a novel Arabidopsis ozone-induced cDNA by differential display[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29: 91—98.
- [14] Fischer A, Saedler H. Restriction fragment length polymorphism coupled domain directed differential display: a

- highly efficient technique for expression analysis of multigene families[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 5331—5335.
- [15] Knaap E van der, Knende H. Identification of a gibberellin-induced gene in deepwater rice using differential display of mRNA[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 589—592.
- [16] 何祖华, 吴玉良, 董继新, 等. 分子生物学新方法[J]. *生命科学*, 1999, 11(增刊): 129—131.
- [17] 黄贵修. 利用差异显示技术探索橡胶树死皮病因的研究[D]. 海南儋州: 华南热带农业大学, 1999.
- [18] Jacobs A. Molecular analysis of cold resistance in chilean potato species. A minor field study. Working paper international rural development centre, Swedish University of Agriculture[J]. *Science*, 1996, 305: 15.
- [19] Chen X F, Wang B Y, Wu R, et al. The level of a mRNA with sequence similarity to the old yellow enzyme-NADPH dehydrogenases increases in *Chenopodium rubrum* cells in response to cytokinin[J]. *Jour Plant Physiol*, 1996, 149(12): 233—236.
- [20] Appleyard V C L, Unkles S E. Secondary metabolite production in filamentous fungi displayed[J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 247: 338—342.
- [21] Li F S, Barnathan E, Kariko K. Rapid method for screening and cloning of cDNA generated in differential mRNA display, application of northern blot for affinity capturing of cDNAs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(9): 1764—1765.
- [22] Khushbeer M, Lisa F, Walter C M, et al. Interaction and effect of annealing temperature on primers used in differential display RT-PCR[J]. *Nucleic Acid Res*, 1998, 26(3): 854—856.
- [23] Mou L, Miller H, Li J, et al. Improvements to the differential display method for gene analysis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 199(4): 564—569.
- [24] Chapman M S, Qu N, Pascoe S, et al. Isolation of differentially expressed sequence tags from steroid-responsive cells using mRNA differential display[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1995, 108(1): 1—7.
- [25] 宁顺斌, 王玲, 宋运淳. 几种差别表达显示技术及其在植物方面的应用[J]. *生命科学*, 1999, 11(3): 140—144.
- [26] Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22: 5640—5648.
- [27] Lauren S, Stephen J, Timothy C B, et al. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23(22): 4738—4739.

The theory of DDRT-PCR and its applications in plants

WANG Xi-ping¹, LIU Zhen-zhong², QIN Bao-fu², ZHAO Ming-de¹

(1 College of Horticulture; 2 College for Life Science, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: mRNA differential display reverse transcription-PCR (DDRT-PCR) is a useful technique for analyzing differential gene expression at transcription level. The theory and characters of mRNA differential display (DDRT-PCR) and its applications to differentially expressed gene, gene cloning, the mechanism of hormone regulation and control, and resistance to adverse are reviewed. The main problems of mRNA differential display and its improved methods are introduced in the paper.

Key words: DDRT-PCR; differentially expressed gene; gene cloning