

# 差异显示的改进及其在木本植物研究中的应用

曾燕如<sup>1\*</sup> 张 鸣<sup>2</sup>

(1 浙江林学院生命科学学院 临安 311300 2 徐州医学院 徐州 221000)

**摘要** 从差异显示的基本原理出发,概述了差显的优缺点及其近年来在实验方法上的改进,并简要介绍了差显在植物尤其是木本植物研究中的应用。

**关键词** 差异显示 木本植物 应用

差异显示反转录聚合酶链式反应(differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR)的问世是基因分离方法上的一个突破,它是目前使用频率最高的用于克隆未知基因的方法。据美国 Medline 1999 年 12 月的调查,用 DDRT-PCR、SH(差减杂交, subtractive hybridization)、RAP-PCR(RNA 指纹技术, RNA arbitrarily primed PCR)、RDA(代表性差异分析, representational difference analysis)、SAGE(基因表达系列分析, serial analysis of gene expression)、DNA 微阵列(DNA microarray 或 DNA 芯片)来克隆差异表达的基因,一共发表了 1810 篇文章,其中有 67% 采用 DDRT-PCR。由此可见 DDRT-PCR 的实用性与成功性。下面就 DDRT-PCR 的方法及其在木本植物研究中的应用作一概述。

## 1 DDRT-PCR 操作的基本原理

DDRT-PCR 利用绝大多数真核生物基因转录后,加工成熟的 mRNA 3'-端具有一个 Poly(A) 尾巴这一特性,在反转录酶的作用下,用 3'-端含有 Poly(T) 的锚定引物对来自两种或两种以上对比材料的 mRNA 进行反转录。在这个锚定引物中,与 Poly(T) 紧密相连的碱基分别是 C、G 及 A,而四种碱基与这三个碱基又有十二种组合(即形成两个碱基锚定的 oligo-dT 引物,也即双碱基锚定引物),这样就可以将某一时间某一组织提取出来的所有 mRNA 反转录形成的 cDNA 分成十二个亚群。由于这些 cDNA 中代表某一特定细胞类型或发育阶段的 mRNA 种

的含量是相当低的,因此,利用一定数量的锚定引物及与 cDNA 5'-端进行退火反应的随机引物组成的引物对就可以使不同长度的基因片段得以扩增。扩增以后利用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳,对 PCR 扩增产物进行分离,并就基因表达的差异进行比较。最后将差显的基因片段从凝胶上切割下来,用相同的锚定引物-随机引物对分离的片段进行二次扩增,并作进一步的深入研究。

## 2 DDRT-PCR 的优点、存在的问题

DDRT-PCR 将几个样品的比较与 PCR 的敏感性相结合,具有起始 RNA 用量少、简便快速、准确、灵敏度高、重复性好、结果可靠、可同时比较多个样品、可进行多基因家族的表达分析等优点,并可恢复序列信息,开发用于 cDNA 分离的探针,深化分子及功能特性的研究。其不足之处在于,由于某些序列的特异性,一些差异表达的转录本不能得到分离<sup>[1]</sup>;又由于反转录的是靠近 Poly(A) 尾巴的 mRNA 序列,因此往往检测不到上游表达的基因信息;扩增产物中存在引物及碱基序列相同,电泳时发生共迁移,但碱基长短略有不同的(有时相差 1~2 个碱基) cDNA 片段簇<sup>[2]</sup>,其中某些片段源自差异表达的基因,某些源自组成型表达的基因。直接将这样的差异片段用作探针进行 Northern 杂交时往往会出现涂布状,进而影响真正差异表达的目的基因的检测<sup>[3]</sup>。而经常碰到的问题是假阳性,有时假阳性的比例高达 50%~75%。

## 3 DDRT-PCR 法的改进

### 3.1 引物的设计

DDRT-PCR 自问世以来,伴随着实践中出现的

修回日期: 2002 11 25

\* 电子信箱: zengur@hotmail.com 或 yrzeng@2jfc.edu.cn

问题,在多个方面进行了改进。锚定引物由双碱基的十二个组合缩减到三个单碱基的锚定引物<sup>[4]</sup>,减少了工作量,提高了工作效率,节约了操作费用。引物的长度则比原来的10个碱基要长得多。美国 Beckman 公司在锚定引物 oligo dT 的上游增加了17个碱基长度的噬菌体 T7RNA 聚合酶启动子引发位点序列,使得锚定引物的长度达31个碱基,并带有四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine, TMR)的荧光标签;随机引物在设计上虽然仍采用 Liang 等最初提出的碱基长度,但在引物的5'-端增加了16个碱基的M13通用反向序列,使得随机引物的长度达26个碱基。这样的设计一方面可以从转录本的5'-端及3'-端进行定向测序,减免了片段/载体的亚克隆,另一方面由于引物长度的增加,使得退火的条件更加苛刻,因此可防止扩增过程中的碱基错配及非特异性二级产物的形成,进而减少了假阳性。长引物对的设计结合使用荧光成像扫描仪,可对差显片段进行快速、敏感的检测,这是因为荧光 cDNA 谱带的背景较浅,cDNA 片段成簇的现象较少。比较而言,放射性同位素(以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP 为例)标记在链的延伸过程中被结合,两条 cDNA 链同时被标记,易形成双联体,而 TMR 标签只有在锚定引物上存在,每个引物分子只一个荧光标记,很少形成双联体,差显所观察到的产物就是由 poly(A) mRNA 转录而来的,故假阳性比率低。将这样的引物设计与 DNA 测序长胶相结合,可分离大至 1.5kb 的差显片段,弥补了过去测序胶短的不足,因而可获得更多、更完整的基因编码信息。

对于差显分析时出现的非重复条带, Rohrwild 等<sup>[5]</sup>认为,这是偶尔由引物与 cDNA 不完全退火引起的。由于次黄嘌呤核苷碱可以相类似的结合力与 A、C、G、T 配对<sup>[6]</sup>,因此引物中包含次黄嘌呤核苷就可增加重复条带的数量,进而减少假阳性。但引物中次黄嘌呤核苷的个数不同,PCR 的优化条件不同,且引物合成比一般的引物合成要昂贵<sup>[7]</sup>。

### 3.2 假阳性的排除

对于测序胶上大小类似但碱基序列不同、发生共迁移的污染片段(非目的基因片段),常用的筛选阳性克隆的方法包括 Northern 印迹法、RNase 保护分析、量化 PCR(quantitative PCR)、差异筛选及原位杂交等。但这些方法所需的 mRNA 量较大,有时有必要对各个假定的阳性克隆进行检测,对大规模的筛选来讲并不是最适合的。已报道的其它方法有

Mathieu Daude 等<sup>[8]</sup>用单链构象多态(single strand conformation polymorphism, SSCP)来筛选差异扩增片段的方法; Geisinger 等<sup>[9]</sup>用含有 DNA 配基(ligand)双亚氨基苄(bisbenzimidazole)的琼脂糖进行电泳分离的方法; Vogel & Liange 等<sup>[2]</sup>则将比较的两个 RNA 源在经过 DDRT-PCR 后,与一个差异片段所产生的各个克隆进行杂交,通过比较杂交结果,区分出组成型表达的基因及差异表达的片段; Poirier 等<sup>[10]</sup>利用放射性标记的扩增 RNA(amplified RNA, aRNA),以至少 1:40000 的灵敏度来检测 mRNA 的表达。

## 4 DDRT-PCR 的应用

DDRT-PCR 自问世以来已得到了广泛的应用。目前,已广泛用于发育生物学、神经科学、病理学、内分泌学、植物生理学的研究与癌症研究。近三年在植物界,已有多种植物差异表达的基因分析是用 DDRT-PCR 来进行实验操作的,如拟南芥、水稻、小麦、大麦、芦笋、豌豆、大豆、玉米、棉花、蚕豆、烟草、红花、草莓、膨大矮牵牛、兰花、冰叶日中花、红藜、苜蓿、花蔺草、番茄、芸苔、大戟、鸢尾、甜菜、甘蔗、菠菜、向日葵、土豆、白羽扇豆等,其中以农作物、草本植物应用差显进行研究的实例居多。木本植物中差显的应用较少,但近三年已在几种植物中取得了进展。

### 4.1 DDRT-PCR 在木本植物抗逆基因分析中应用

利用差显分析植物的抗逆基因,一般将逆境条件下培养的材料与正常条件下培养的材料作对比。周涵韬<sup>[11]</sup>在红树抗盐相关基因的分析中,利用 DDRT-PCR 法在高盐(0.5% 海水)与低盐(0% 盐度海水)条件下培养白骨壤叶片间进行比较分析,分离得到了三个白骨壤抗盐相关的差显片段,其中一个确认为长度为 593bp 的抗盐相关基因片段,但与 GenBank 已有的数据无同源性。

### 4.2 DDRT-PCR 在木本植物体胚发生研究中应用

在木本植物中,现常将 DDRT-PCR 与细胞工程过程中的体胚发生研究相结合,用于分析体细胞胚发育过程中的特异基因。Cairney 等<sup>[12]</sup>利用差显就火炬松杂合体胚与体细胞胚发育过程新陈代谢状态间的生理生化差异进行了比较,分离了约 500 条差显的 cDNA,其中约 1/3 与 GenBank 的数据同源,并试图利用研究结果改进体细胞胚发生的实验操作方法,对组培过程中胚的发育进行调节; Pullman 等<sup>[13]</sup>就火炬松杂合子胚与体细胞胚间基因表达的差异

用差显的方法进行了分析, 结合基因芯片的分析方法, 分离得到了差异表达的基因, 并发现体细胞胚后期的基因表达与杂合体胚中期的基因表达相似; 崔凯荣等<sup>[14]</sup>利用差显技术, 对枸杞体细胞胚发生早期的胚性愈伤组织、继代愈伤组织及早期胚状体进行了分析, 发现了三个在体细胞胚发生早期组织中基因特异表达的片段, 得出了在体胚发生早期有胚胎发生特异性基因的表达, 而这种特异表达的基因在继代愈伤组织中没有表达, 体细胞胚发生过程就是细胞内基因差别表达的结论。

#### 4.3 DDRT-PCR 在木本植物生长发育研究中的应用

植物激素在调节植物生长发育过程中起着十分重要的作用。将激素处理与未处理的对照作为比较对象, 利用差显技术就可从分子水平研究植物激素的作用机理。Hutchison 等<sup>[15]</sup>在用外源生长素吲哚-3-丁酸诱导火炬松不定根形成基因表达的研究中, 用 DDRT-PCR 得到差异表达的基因片段, 经与 GenBank 的数据进行同源性比较, 发现所得的基因片段与裸子植物中  $\alpha$ -苹果菌素(或棒曲霉素, Expansin) 基因家族十分相似; Itai<sup>[16]</sup>用差显结合 cDNA 文库筛选的方法, 确认了一个果实成熟时的上调基因 *JPRYL*, 这个基因编码的多肽与细菌  $\beta$ -D-木糖苷酶十分相似, 其转录本在果实成熟过程、采收后及老叶的黄化过程中有所积累, 表明这个基因是与衰老相关的基因; Ramina 等<sup>[17]</sup>利用差显技术, 识别并分离了 9 个与桃幼果脱落相关的 cDNA 片段, 发现其中 5 个与丙烯诱导的脱落诱导有关; 尽管这些基因片段与脱落有关, 但没有一个是在脱落层中专门被诱导的, 而至少有两个在附近的组织中有所积累; 这两个 cDNA 片段与胶乳及  $\beta$ 1, 3-葡聚糖酶基因具有同源性; 胶乳样基因专门在脱落前的果柄中表达, 是被丙烯下调的; 丙烯处理后, 所有的被检组织中都检测到了有  $\beta$ 1, 3-葡聚糖酶转录本的积累; 这两个基因分别参与与脱落有关的伤口愈合及对植物病原菌的防卫作用。另外, 油棕开花异常基因<sup>[18]</sup>、苹果果实早期发育基因<sup>[19]</sup>的研究中也用到了差显技术。美国密执安理工大学林业与木制品学院木材研究所植物生物技术研究中心的研究人员正利用差显技术进行木质素生物合成、木材形成及树木快速生长相关 cDNA 的识别<sup>[20]</sup>。此外, 利用差异显示技术还可在突变型及野生型间就突变进行比较研究。

#### 4.4 DDRT-PCR 在植物抗病基因分离中的应用

植物有两类抗病基因。一类是防卫基因, 它是植物自身固有的基因, 它们的翻译产物对病原的增殖起直接的抑制作用, 且这种抑制是广谱性的, 对许多病原菌都有作用。另一类是抗性基因, 它是对某一病原菌具专性抗性的基因。抗性基因仅存于抗病植物体内, 它与病原体的 *avr* 基因(病原体无毒基因, Avirulence) 互作后使植物表现出抗病性, 即抗性基因是在病原菌诱导后才表达的。在木本植物的抗病研究方面, 利用差显技术比较感病与抗病植株/无性系病原菌诱导的材料, 可分析包括防卫基因在内的组成型表达的基因差异及病原菌诱导的抗性基因表达上的差异。目前我们正利用差显技术进行杨树的抗病基因研究。

### 5 展望

DDRT-PCR 从基因的转录水平着手研究基因的表达, 并已得到了令人欣慰的成果, 这些成果又促进了该技术的发展, 有关差显的专著、试剂盒亦已相继问世, 差显的发明者 Peng Liang 博士从 1997 年开始, 每年举办一期有关差显的培训班。所有这些都有利于 DDRT-PCR 方法的推广与应用。

在 DDRT-PCR 的基础上又出现了许多衍生的方法, 如有序差显 (ordered differential display, ODD)<sup>[21]</sup>, 该法又名差异表达序列的限制性内核溶解分析 (restriction endonucleolytic analysis of differentially expressed sequences, READS), 已用于淡水生物 *Dugesia tigrina* 分子区域性标记 (molecular regional marker) 的寻找。另外还有 RNA 指纹技术 (RNA arbitrarily primed PCR, RAP-PCR)、带有选择引物的 DDRT-PCR (SPR)、定向显示 (targeted display) 等。所有这些对揭示生命的奥秘具有十分重要的意义。

### 参考文献

- [1] Ghosh S A. Novel ligation mediated PCR based strategy for construction of subtraction libraries from limiting amounts of mRNA. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24 (4): 795~ 796
- [2] Vogel R, Lange R, Burckert N, Boller T, et al. Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Research*. 1996, 24 (7): 1385~ 1386
- [3] 刘勋甲、郑用璜. mRNA 差异显示技术及其应用. *生命科学*. 1998, 10(4): 176~ 179
- [4] Liang P, Zhu W, Zhang X, et al. Rapid selection and classification

- of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res.* 1994, 22: 5763~ 5764
- [ 5 ] Rohrwild M et al. Inosinic containing primers for mRNA differential display. *Trends in Genetics.* 1995, 11: 300
- [ 6 ] Novelli G, Gennarelli M, De Santis L, et al. Inosine containing primers in human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *Biomed. Pharmacother.* 1992, 46: 167~ 169
- [ 7 ] Rohrwild M, Alban R S, Liang P, et al. Inosine containing primers for mRNA differential display. *Trends in Genetics.* 1995, 11: 300
- [ 8 ] Mathier Daude F, Cheng R, Welsh J, et al. Screening of differentially amplified cDNA from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24: 1504~ 1507
- [ 9 ] Geisinger A et al. A simple method for screening cDNAs arising from the cloning of RNA differential display bands (unpublished).
- [ 10 ] Poirier G M C, Pyati J, Wang J S, et al. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research.* 1997, 25 ( 4 ): 913~ 914
- [ 11 ] 周涵韬. 几种红树植物的遗传变异和抗盐特性的分子生态学研究. 厦门大学生命科学院博士论文. 2001.
- [ 12 ] Caimey J, Xu N F, Maday J, et al. Transcript profiling: a tool to assess the development of conifer embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant.* 2000, 36 ( 3 ): 155~ 162
- [ 13 ] Pullman G S et al. Gene expression differences between zygotic and somatic embryos monitored by differential display and cDNA array: a potential tool to improve loblolly pine somatic embryo quality. *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century.* Proceedings of the IXth International Congress of the International Association of Plant Tissue Culture and Biotechnology, Jerusalem, Israel, 14~ 19 June 1998. 1999, 81 ~ 84; *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture Vol.* 36
- [ 14 ] 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. *遗传.* 1998, 20( 5 ): 16 ~ 19
- [ 15 ] Hutchison K W, Singer P B, McInnis S, et al. Expansins are conserved in conifers and expressed in hypocotyls in response to exogenous auxin. *Plant Physiology.* 1999, 120: 3, 827~ 831
- [ 16 ] Itai A, Yoshida K, Tanabe K, et al. A beta D xylosidase like gene is expressed during fruit ripening in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Journal of Experimental Botany.* 1999, 50( 335 ): 877 ~ 878
- [ 17 ] Ramina A, Bonghi C, Giovannoni J J, et al. Differential display and isolation of cDNAs corresponding to mRNAs whose abundance is influenced by ethylene during peach fruitlet abscission. *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene II. Proceedings of the EU-TMR Euroconference Symposium, Thira ( Santorini ), Greece, 5~ 8 September, 1998.* 1999, 249~ 254
- [ 18 ] Rival A, Tregear J, Verdeil J L, et al. Molecular search for mRNA and genomic markers of the oil palm “mantled” somaclonal variation. *Proceedings of the international symposium on biotechnology of tropical and subtropical species, part II, Brisbane, Queensland, Australia, 29 September 3 October 1997.* *Acta Horticulturae.* 1998, 461: 165~ 171
- [ 19 ] Dong Y H, Yao J L, Atkinson R G, et al. MDH1: an apple homeobox gene belonging to the BEL1 family. *Plant Molecular Biology.* 2000, 42 ( 4 ): 623~ 633
- [ 20 ] Hao L H et al. The application of differential display in wood biotechnology. *Proceedings of the Second International Wood Biotechnology Symposium, Canberra, Australia, 10~ 12 March, 1997.* 1999, 207~ 217
- [ 21 ] Matz M, Usman N, Shagin D, et al. Ordered differential display: a simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucleic Acids Research.* 1997, 25 ( 12 ): 2541~ 2542

## Improvement of Differential Display and Its Application to Studies of Woody Plants

Zeng Yanru<sup>1</sup> Zhang Ming<sup>2</sup>

( 1 Faculty of Life Science Zhejiang Forestry College Lin'an 311300 2 Xuzhou Medical College Xuzhou 221000)

**Abstract** Based on the fundamental principle of differential display, this paper outlines the advantages and disadvantages of differential display and its experimental improvement made in recent years. In addition, the application of differential display to studies of plants, especially woody plants, is also introduced here.

**Key words** Differential display Woody plant Application