

抑制差减杂交 (SSH) 技术及其在植物基因分离上的应用*

李广存^{1,2} 金黎平¹ 谢开云¹ 屈冬玉^{1**}

(1 中国农业科学院蔬菜花卉所 北京 100081 2 山东省农业科学院生物中心 济南 250100)

摘要 SSH 是一种基于抑制 PCR 和差减杂交技术建立的,在转录水平上研究基因表达的技术,具有稳定、高效、可靠的特点,可对生物的生长、发育、衰老、死亡等生命过程及生物或非生物逆境胁迫对生物所造成的影响等进行全面、系统的分析。简单介绍了 SSH 的基本原理、技术要点,并对技术本身的改进和提高及在转录水平上与其它技术方法的比较及其在植物基因分离上的应用进行了概述。

关键词 SSH 基因分离 差异表达

基因克隆主要在三个不同的水平上进行:基因组水平、转录水平和蛋白质组水平。基因组水平的基因克隆方法主要有图位克隆法(map based cloning 或 positional cloning)、转座标签法(transposon tagging)和抗病基因类似序列法(又称候选基因克隆法, resistance gene analogs, RGAs)。蛋白质组水平的基因克隆方法主要涉及到蛋白质的电泳技术,从中找出差异蛋白后进行氨基酸序列测定,反推出其部分核苷酸序列并设计 DNA 引物,进而分离出编码该差异蛋白的基因。转录水平寻找和分离基因的方法主要有:差别杂交筛选、差减库构建、代表性差别分析、差异显示、cDNA 阵列杂交、基因表达系列分析、cDNA 扩增长度多态性及抑制差减杂交等。真核基因组中只有 15% 的基因得到表达,从转录水平进行基因的寻找和分离将会简化分析背景,使目标序列相对富集,便于克隆,且一次可得到许多差异表达基因片段,较之从基因组和蛋白质组水平寻找和分离基因更加便捷和简单有效。

抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是基于抑制 PCR 和差减杂交技术建立的简单有效的方法^[1],通过一次差减杂交可使低丰度的序列(mRNA)得以高于 1000 倍的富集,有效的选择性扩增目标序列,同时抑制非目标序列

的扩增,因此在分离基因特别是分离低丰度差异表达基因方面具有更广阔的应用前景。

1 抑制差减杂交技术

1.1 抑制差减杂交技术的基本原理及主要步骤

抑制差减杂交技术运用了杂交二级动力学原理,即高丰度的单链 cDNA 在退火时产生同源杂交的速度快于低丰度的单链 cDNA,在试验组(tester)和驱动组(driver)的 cDNA 变性后再复性的过程中,原来在丰度上有差别的单链 cDNA 达到均一化。同时,由于试验组的 cDNA 在进行杂交之前等分的两份加有不同的接头,因此杂交时将产生 5 种不同类型的分子 a、b、c、d 和 e(图 1),当采用与两个不同接头序列互补的引物进行 PCR 扩增时,只有目标序列得到有效扩增,非目标序列因两端存在反向重复序列,退火时易产生类似“锅柄”的结构,无法与引物配对,扩增受到抑制。

抑制差减杂交(SSH)技术的主要步骤有:(1) cDNA 的合成与酶切;(2) 试验组 cDNA 分成两份,并与两个不同的接头连接;(3) 试验组的 cDNA 与过量的驱动组 cDNA 杂交;(4) 选择性 PCR 扩增与接头相连的试验组 cDNA 分子;(5) 克隆 PCR 产物,构建差减文库;(6) 筛选文库。

1.2 抑制差减杂交技术的发展和提高

差减杂交是一种富集差异表达基因的有效方法,该方法早在 20 世纪 60 年代中期已用于纯化 T4

收稿日期:2004-05-28 修回日期:2004-08-03

* 国家“863”计划资助项目(2003AA207130)

** 通讯作者,电子邮箱:dyqu@mail.caas.net.cn

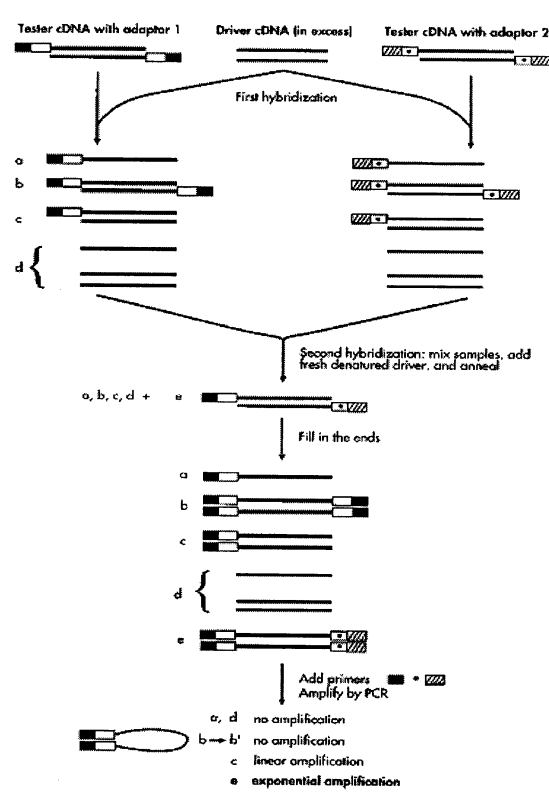


图1 SSH方法示意图

黑色实线(——)示:经限制性内切酶 *Rsa*I 消化后的实验组 (tester) 和驱动组 (driver) cDNA; 黑色实框 (■) 示: 与 PCR 引物 P1 互补的接头 1 的外面部分; 黑色虚框 (▨) 示: 与 PCR 引物 P2 互补的接头 2 的外面部分; 空白框 (□) 示: 与巢式 PCR 引物 PN1 和 PN2 互补的接头的内部; 注: 具有接头 2 的 a 型、b 型和 c 型分子未示出

噬菌体 mRNA, 但其应用受所需 mRNA 量大的限制。1990 年 Duguid 等^[2] 对该方法加以改进, 在 cDNA 中引入了一个普通接头, 使得在杂交循环中可选择性扩增试验组 cDNA。1996 年 Diatchenko 等在此基础上对其进一步完善, 建立了抑制差减杂交技术, 使得差异表达基因在一次杂交中得以均一化和高于 1000 倍的富集, 为分离低丰度的差异表达基因提供了方便。1999 年 Diatchenko 等^[3] 以睾丸为材料描述了 SSH 库的构建及筛选的具体细节。同年, Yang 等^[4] 将 SSH 与 cDNA 微阵列筛选技术进行了有机结合, 大大提高了鉴定差别表达基因的效率, 但此方法仍存在明显不足, 如: 微阵列筛选对于 cDNA 插入片段小, 丰度太低的 mRNA 效果不佳, 特别是对于 5' 端小短序列不易检测到。SSH 方法自建立以来, 尽管已在许多领域被广泛使用, 但人们对其实际功效和潜在局限性的理解还不够深入。为研究确定影响 SSH 效率的因素, Ji 等^[5] 基于假定

cDNA 杂交符合理想的二级动力学原理, 提出了一个理论模型, 并以纤维原细胞 cDNA 为材料, 加入 ϕ x174 DNA 作为差异表达基因进行了研究, 结果表明: 影响 SSH 效率的关键因素是目标基因在两个 cDNA 样品中的浓度比例, 差异表达基因是否得到有效富集主要取决于这个浓度比例, 浓度比例越大, 富集越有效; 一般来讲, 要得到差异表达基因的有效富集, 目标基因的浓度应高于 0.01%, 且目的基因在两个样品中的浓度比例也应达到 5 倍以上。

限制酶的酶切效率和接头的连接效率是成功应用 SSH 方法的关键。接头连接后用磁珠分离纯化试验组中已经连上的片段可大大提高差减的效率, 用这种改进的 SSH 方法分离 EBV 中差异表达基因, 在表达差异大的 44 个 cDNA 克隆中有 20 个基因的表达到差异达 3 倍, 且其中有 7 个是 EBV 基因^[6]。

有效降低或消除 SSH 库中非差异表达的转录本背景克隆对差减库的筛选至关重要。MOS (mirror orientation selection) 方法的建立为解决转录本背景克隆问题提供了可能, 它基于目标克隆和背景克隆的差异 (每种背景克隆分子都只有一个与 SSH 中两个不同的接头序列相应的方向, 而真正差异表达的目标 cDNA 片段都具有两个序列方向) 只选择那些镜像分子, 从而达到减少背景克隆的目的^[7]。

为拓展 SSH 的应用范围, Levesque 等^[8] 在 SSH 法的基础上建立了一种基于片段大小进行 SSH 差减库的筛选、克隆全长 cDNA 的方法。该方法首先用 SSH-cDNA 作为 ³²P 标记探针, 采用 Northern 方法检测表达的水平 and 模式, 并建立它们相应的全长 cDNA; 然后, 在琼脂糖凝胶上将大小不同的 cDNA 分开, 建立不同大小的 cDNA 质粒库, 并用 SSH-cDNA 片断进行杂交筛选。该策略对于特殊目标基因的分离及功能基因组研究具有特殊功效。

SSH 方法不仅可在转录水平上研究基因的差异表达并分离差异表达基因片段, 在基因组水平上也有其独到的应用, Li 等^[9] 将 SSH 和 DNA 微阵列技术相结合, 从 *Dendrobium* 的 5 个种中找到了区分它们的种特异性探针, 并对它们进行有效的区分和鉴定。其主要策略为: 首先通过 SSH 在两个种间得到差异基因组 DNA 片段, 然后用所得到的不同的基因组 DNA 片段与多个不同种的完整基因组的 DNA 阵列杂交, 来筛选某一个种特有的基因组 DNA 片段, 筛选出的特异基因组 DNA 片段即可被用来作为种特异性探针来鉴定、区别不同的种。

2 SSH 法与其它转录水平上基因克隆方法的比较

生物的生长、发育、衰老和死亡等生命过程伴随着复杂的生理生化变化,也是生物体内基因在时空上有序表达和调控的结果,即基因的选择性差异表达的结果。分离和克隆差异表达基因对于了解和揭示生物的生命活动规律,进而进行生物的改变、抗逆、抗病等研究具有重要的理论和实践意义。

目前进行基因差异表达研究的方法很多,主要为两类:基于 PCR 的方法和基于杂交的方法。这些方法均已成功用于植物病理、胚胎发育、形态发生、信号传导、抗逆、抗病等众多领域,并成功地分离了相关基因。这些方法并非非常完善,对一项具体研究而言,选择合适的方法是十分重要的。为了更好地理解和使用这些方法,表 1 对其进行了比较。

表 1 转录水平上主要基因分离方法的比较与分析

技术	优点	不足
EST sequencing	1 数量可知 2 勿需已知基因序列信息 3 可与已有序列库比较	1 成本高
SAGE	1 数量可知 2 可与已有序列库比较 3 比 EST sequencing 成本低	1 需要较大的参考数据库 2 短标签随机性大
DDRT-PCR	1 低成本 2 操作简便,灵敏度高	1 假阳性高,重复性差 2 需进一步分离片断和测序 3 需要进行大量的引物筛选工作、得到的特异 cDNA 片段往往是 3' 端的非编码序列
cDNA-AFLP	1 低成本 2 采用特异的引物组合克服了 DD 的不足	1 需要较大的参考数据库 2 需进一步分离片断和测序
cDNA-RDA	1 靶序列可在三轮杂交后得到百万倍以上富集 2 避免了引物错配问题,假阳性低	1 需要高质量的 cDNA 2 当靶序列浓度较低时,其富集受抑制等 3 操作繁琐,实验周期长、成本高
SSH	1 速度快、效率高:一轮 SSH 过程仅需 3~4 天,且一次可分离几十至上百个差异表达基因 2 阳性率高:可高达 94% ^[10] 3 灵敏度高:可使低丰度 mRNA 得以高于 1000 倍的富集 4 实验结果易于分析	1 与 RDA 相比,SSH 只进行一轮杂交循环,差异基因的富集程度仍然不够充分,特别是当 Tester 与 Driver 两群体间的差异较小时,仅一轮杂交将造成假阳性率升高 2 所需 RNA 量较大(一般为几微克) 3 SSH 中两次 driver cDNA 均过量,可能掩盖 tester cDNA 中某些有表达差别的 cDNA
cDNA microarrays	1 高度自动化 2 易分析待分析的转录本 3 勿需已知基因序列信息 4 表达差异较小的或是低拷贝的基因也可得到克隆	1 存在交叉杂交信号干扰 2 需要克隆和 PCR 所要求的药品 3 成本高 4 对基因序列信息的依赖使该方法只能用于研究较深入的少数物种

从上述 SSH 与其他方法的比较中可以看出,SSH 在许多方面具有其独到的优越性:该方法操作简便、周期短,且阳性率高,可高达 94%;同时该方法的最终结果是获得差异表达基因片断的克隆,避免了其它方法只获得基因片断尚需进一步分离和克隆的步骤,并且在进行阳性克隆筛选时,可与高通量的筛选方法如: cDNA 微阵列、高密度点阵膜等有机结合,大大加快了筛选速度,有利于快速建立基因表达谱。从整体上了解生物(细胞)在特定时期

或特定环境下的基因表达动态;该方法灵敏度高,可使低丰度的 mRNA 得以高于 1000 倍的富集,较之其它方法更易于在转录水平上研究生物受生物或非生物逆境胁迫后基因的差异表达,特别是对于低丰度的差异表达基因的分离和克隆。此外,该方法应用范围广,不仅可在转录水平上研究基因的差异表达,还可在基因组水平上通过研究基因组的差异,找出差异片断作为探针对不同的种进行区分和鉴定。

3 SSH 方法在植物上的应用

SSH 方法已成功用于细胞分化、发育、再生、衰老等的研究中和分离不同器官组织之间、个体不同发育阶段以及受外界因子作用而差异表达的基因等方面, 相关论文达 300 余篇, 且主要集中在动物

和人的研究上(GenBank)。尽管该方法在植物上的应用起步较晚, 自 1999 年首次应用该方法以来, 已有 40 余篇有关该方法在植物上应用的报道, 涉及到水稻、玉米、小麦、马铃薯、大豆、辣椒、胡萝卜、大麦、棉花、康乃馨、拟南芥、甘蔗、甜菜、人参、芒果、灌木、梭梭、橡胶树等近 20 种植物(表 2)。

表 2 SSH 方法在植物上应用的部分实例(GenBank)

相关基因名称	来源材料	参考文献
马铃薯晚疫病菌诱导 HR 早期基因	马铃薯	[11]
CFMF 5, CFMF 6, CFMF 7, CFMF 9, CFMF 10	康乃馨	[12]
辣椒素的生物合成相关基因	辣椒	[13]
WRKY53	拟南芥	[14]
bIti2	大麦	[15]
甜菜根表达基因 cDNA 片段	甜菜	[16]
TRIA 调节基因	水稻	[17]
硝酸盐诱导基因	水稻	[18]
芒果生长素反应因子类蛋白基因	芒果	[19]
Al(3+) 胁迫诱导基因	甘蔗	[20]
人参皂苷生物合成相关基因	人参	[21]
HvCaBP	大麦	[22]
RH3 基因	水稻	[23]
水杨酸诱导表达基因和几个被称作 OBP3 响应基因(ORGs) 的假定基因	拟南芥	[24]
GmPAP3	大豆	[25]
ARF6	马铃薯	[26]
水稻幼穗发育早期特异表达的基因	水稻	[27]
水稻矮化突变体相关 cDNA 片段	水稻	[28]
梭梭幼苗渗透胁迫诱导相关基因	梭梭	[29]
小麦抗病基因	小麦	[30]
胡萝卜体细胞胚根发育相关基因	胡萝卜	[31]
马铃薯晚疫病抗性相关基因	马铃薯	[32]
玉米幼苗淹水诱导基因	玉米	[33]
水稻磷饥饿诱导基因	水稻	[34]
小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA	小麦	[35]

利用 SSH 方法已获得一批源于植物的目的基因片断, 如在小麦抗白粉病基因的研究中, 所获得的 EST 中有 54. 1% 为抗病相关基因, 参与了小麦抗白粉病反应^[30]; 在水稻幼穗发育早期特异表达基因的研究中, 获得的 40 个候选克隆中有多于 40% 的克隆在茎尖分生组织和幼穗分生组织中特异表达或表达增强等^[27]。同时在利用 SSH 法研究植物基因表达的过程中, 发现了一些功能未知的可能新基因, 如在硝酸盐诱导水稻基因的差异表达研究中, 发现 55 个可能新基因^[18], 在玉米幼苗淹水诱导基因的研究中, 发现 21 个可能新基因^[31], 在水稻磷饥饿诱导基因的研究中, 有 47 个基因功能未知等^[34]。

目前 SSH 方法在植物上的应用主要是两个方

面, (1) 植物的生长发育及组织特异性研究: 辣椒素的生物合成相关基因的分离^[13], 甜菜根表达基因的分离和鉴定^[16], 人参皂苷生物合成相关基因的筛选^[21], 水稻幼穗发育早期特异表达基因的分离^[27], 胡萝卜体细胞胚根发育相关基因的分离^[31]等。(2) 生物及非生物逆境对植物的影响及引起的基因差异表达研究: 马铃薯晚疫病菌诱导 HR 早期基因的表达^[11], 硝酸盐诱导水稻基因的差异表达^[18], Al(3+) 胁迫诱导甘蔗基因的差异表达^[20], 梭梭幼苗渗透胁迫诱导相关基因的分离和克隆^[29], 马铃薯晚疫病抗性相关基因的研究^[32], 玉米幼苗淹水诱导基因表达^[33], 水稻磷饥饿诱导后的基因差异表达^[34], 小麦幼苗水分胁迫诱导表达^[35]等。而在其他方面, 如: 表达调控、衰老、凋亡等则

涉及较少, SSH 方法在植物上的应用范围还有待于进一步扩展。总之, SSH 方法作为研究基因差异表达的成熟技术在植物上的应用已经拉开序幕, 其前景十分广阔。

4 总 结

综上所述, SSH 方法已成为研究生物或非生物逆境信号诱导表达的相关基因, 生物的生长、发育、衰老、死亡等生命过程的最有效的方法之一。

深入细致地了解该方法的特点及使用要求是有效使用它的前提。SSH 方法一般只用于两个样品的差异比较分析, 样品间的差异不宜太大或太小, 而对于多个样品则无能为力, 这在很大程度上限制了它的应用。提取 tester RNA 的时期非常关键, 选择使用该方法时, 首先要根据不同的研究目的确定取材的最佳时期, 取材时期不当将会给试验带来意想不到的困难, 或许只得到很少几个差减克隆或根本得不到克隆, 或得到一些非目的克隆。从技术本身讲, 提取的 tester RNA 和 driver RNA 及从中分离的 mRNA 的质量、限制酶的酶切效率、接头的连接效率、第二次 PCR 产物的转化效率及差减克隆的筛选方法等关系着试验的成败。另外 SSH 所需的起始 RNA 量较大, 一般为几微克, 对于一些珍贵稀有的不易获得足够 RNA 的材料要慎重使用。

SSH 方法在研究植物基因的差异表达方面已得到有效应用, 该方法在应用范围和深度上可进一步拓宽和加深: (1) 利用 SSH 方法研究生物(如细菌和真菌等)和非生物逆境(如干旱和寒冷等)对植物的影响及生物与寄主植物的互作时, 可进一步提早取材时期(如逆境诱导后的 6 小时或更早)和缩短取材间隔, 以获得植物差异表达基因的表达动态和进行有关转录因子等方面的研究, 进而获得植物与逆境互作的关键点, 更好地理解其互作机制, 为从分子水平上定向培育抗旱、抗寒、抗病等作物提供更可靠的理论依据。(2) 将获得的一些差异表达基因片段转化为分子标记, 进行标记辅助选择, 进一步为育种服务。(3) 衰老、凋亡同生长、发育一样也是植物的重要生命活动过程, 利用 SSH 研究了解作物的衰老、凋亡机制, 适当有效地延长或缩短作物的生命周期, 对于提高作物的生物产量和经济产量均具有重要意义。就马铃薯育种研究工作而言, 工作重点主要集中在抗逆(如抗病、抗旱等)、品质及

产量等方面, 利用该方法可进一步了解其机制, 将所获得的相关基因转化为分子标记等, 可加速马铃薯抗逆、品质改良和产量等方面的育种研究进程。目前我们实验正在应用该项技术进行马铃薯青枯病抗性相关基因的分离工作, 并拟建立病菌诱导后特定时期的基因表达谱, 以初步揭示其抗性机制, 为今后顺利开展马铃薯抗青枯病育种奠定基础。(4) 基因的协同表达是植物分子生物学研究的一个重要领域, SSH 方法在转录水平上作为研究生物基因表达的重要方法, 可为研究者展示所研究生物某一特定时期的基因表达轮廓, 此领域的研究将成为今后植物分子生物学研究的一个热点。

随着分子生物学技术的不断发展和完善, 将会涌现出越来越多的新技术和新方法, SSH 与其它新技术和新方法的有机结合将不失为一种分离和鉴定差异表达基因的良策, 如 SSH 与 cDNA 微阵列技术及 MOS 方法相结合对阳性差减产物进行快速、有效的筛选等已经显示出其优越性。总之, 随着 SSH 技术的进一步改进和提高, 它将在新基因的分离和克隆及研究基因的表达调控和植物的生长发育等方面发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries Proc Natl Acad Sci, 1996, 93: 6025~ 6030
- [2] Duguid J R, Dinauer M C. Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 2789~ 2792
- [3] Diatchenko L, Lukyanov S, Lau Y F, et al. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. Methods Enzymol, 1999, 303: 349 ~ 380
- [4] George P Yang, Douglas T Ross. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 1517~ 1523
- [5] Ji W, Wright M B, Cai L, et al. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. BMC Genomics, 2002, 3(1): 12
- [6] Kiss C, Nishikawa J, Diekmann A, et al. Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. J Virol Methods, 2003, 107(2): 195~ 203
- [7] Rebrikov D V, Britanova O V, Gurskaya N G, et al. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive

- hybridization. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(20): E90
- [8] Levesque V, Fayad T, Ndiaye K, et al. Size selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques*, 2003, 35(1):72~ 78
- [9] Li T X, Wang J, Bai Y, et al. A novel method for screening species specific cDNA probes for species identification. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(4): E45
- [10] Von Tein O D, Thies W G, Hofmann M A. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(13):2598~ 2602
- [11] Brich P R J, Avrova A O, Duncan J M, et al. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12(4): 356~ 361
- [12] Kim J Y, Chung Y S, Paek K H, et al. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Mol Cells*, 1999, 9(4): 392~ 397
- [13] Kim M, Kim S. Isolation of cDNA clones differentially accumulated in the placenta of pungent pepper by suppression subtractive hybridization. *Mol Cells*, 2001, 11(2): 213~ 219
- [14] Hinderhofer K, Zentgraf U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. *Planta*, 2001, 213(3): 469~ 473
- [15] Bahn S C, Bae M S, Park Y B, et al. Molecular cloning and characterization of a novel low temperature induced gene, bti2, from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1522(2): 134~ 137
- [16] Kloos D U, Oltmanns H, Dock C, et al. Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. *J Exp Bot*, 2002, 53(373): 1533~ 1534
- [17] Chen X, Yuan H, Chen R, et al. Isolation and characterization of triacontanol regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(8): 869~ 876
- [18] Wang X, Wu P, Xia M, et al. Identification of genes enriched in rice roots of the local nitrate treatment and their expression patterns in split root treatment. *Gene*, 2002, 297(1-2): 93~ 102
- [19] 肖洁凝, 黄学林, 黄霞, 等. 芒果生长素反应因子类蛋白的 cDNA 克隆和表达. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 59~ 62
- [20] Watt D A. Aluminium responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J Exp Bot*, 2003, 54(385):1163~ 1174
- [21] 罗志勇, 陆秋恒, 刘水平, 等. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 2003, 35(6): 554~ 567
- [22] Jang C S, Lee M S, Kim J Y, et al. Molecular characterization of a cDNA encoding putative calcium binding protein, HvCaBP1, induced during kernel development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Rep*, 2003, 22(1): 64~ 70
- [23] Wang Xiaolan, Weng Qingmei, You Aiqing, et al. Cloning and characterization of rice RH3 gene induced by brown planthopper. *Chinese Science Bulletin*, 2003, 48(18): 1976~ 1981
- [24] Kang H G, Foley R C, Onate Sanchez L, et al. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J*, 2003, 35(3): 362~ 372
- [25] Liao H, Wong F L, Phang T H, et al. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. *Gene*, 2003, 318: 103~ 111
- [26] Faivre Rampant O, Cardle L, Marshall D, et al. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene. *J Exp Bot*, 2004, 55(397): 613~ 622
- [27] 刘军, 袁自强, 刘建东, 等. 应用抑制差减杂交技术分离水稻幼穗发育早期特异表达的基因. *科学通报*, 2000, 13: 1392~ 1397
- [28] 王永胜, 王景, 李发强, 等. SSH 法获取水稻矮化突变体相关的 cDNA 片段. *高技术通讯*, 2001, 5: 20~ 24
- [29] 郭新红, 姜孝成, 潘晓玲, 等. 用抑制差减杂交技术分离和克隆梭梭幼苗受渗透胁迫诱导相关基因的 cDNA 片段. *植物生理学报*, 2001, 27(5):401~ 406
- [30] 骆蒙, 孔秀英, 刘越, 等. 小麦抗病基因表达谱中的文库构建与筛选方法研究. *遗传学报*, 2002, 29(9): 814~ 819
- [31] 张雷, 杨志攀, 刘一鸣, 等. cDNA 文库的差异筛选与抑制性减数杂交结合分离胡萝卜体细胞胚根发育相关基因. *自然科学进展*, 2002, 12(3): 261~ 265
- [32] Tian Zhendong, Liu Jun, Xie Conghua, et al. isolation of resistance related genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the R-gene free potato. *Acta Genetica Sinica*, 2003, 30(7): 597~ 605
- [33] Gao Peng, Wang Guoying, Zhao Huji, et al. Isolation and identification of submergence induced genes in maize (*Zea mays*) seedlings by suppression subtractive hybridization. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(4): 479~ 483
- [34] Xia Ming, Wang Shoufeng, Wang Xiaobing, et al. Identification of phosphorus starvation induction genes in rice by suppression subtractive hybridization. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(6): 736~ 741
- [35] 王转, 贾晋平, 景蕊莲, 等. 用抑制差减杂交法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA. *生物技术通报*, 2003, 5: 36~ 39

The Principle of Suppression Subtractive Hybridization Technique and its Application in Plant Gene Isolation

LI Guang cun^{1,2} JIN Li ping¹ XIE Kai yun¹ QU Dong-yu¹

(1 Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081, China

2Bio Tech. Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences Jinan 250100, China)

Abstract Suppression subtractive hybridization (SSH) is a technique for the study of gene expression at transcriptional level, which is based on the suppression PCR and subtractive hybridization. SSH is widely used to study on organism growth and development, senescence and death, as well as the effects of biotic and abiotic stresses on organism due to its high efficiency, stability and reliability. The methodology of SSH and its improvement, application on plant gene isolation are reviewed. Meanwhile, SSH is compared to other different techniques at transcriptional level.

Key words SSH Gene isolation Differential expression

长三角工业与环境生物技术产业发展研讨会暨项目洽谈会

以生物催化为核心内容的工业生物技术在支撑社会进步与经济发展技术体系中的地位已被提到空前的战略高度,并在世界范围内继医药和农业生物技术之后,掀起了第三个高潮。以生物催化、生物加工过程优化技术、生物工程下游技术等生物加工技术为支撑的工业生物技术产业已形成了庞大的产业群。环境生物技术产业在环境的治理和传统产业的改造中具有不可替代的作用。工业和环境生物技术产业的发展,对于轻工食品、医药、化学、石化、造纸、纺织等行业的发展和技术升级将发挥日益明显的作用。为了促进工业和环境生物技术产业的发展,加强该领域的技术交流与合作,江苏省生物技术协会和江南大学将于2004年10月26-28日在南京联合召开长三角工业与环境生物技术产业发展研讨会暨项目洽谈会和协会会员代表大会(理事会换届选举)。

本次内容包括工业生物技术、环境生物技术,其中:工业生物技术产业包括轻工发酵产品(酒和溶剂类、有机酸类、氨基酸类、酶制剂类、食品和饲料添加剂等)、发酵工程药物、生物材料和生物能源等;环境生物技术产业包括清洁生产与污染物的源头控制,废水、固体废弃物、废气生物处理等环境生物技术产业。

专题报告包括:(1)工业生物技术研究的现状和发展趋势(欧阳平凯);(2)能源和环境生物技术的发展(曹竹安);(3)生物农药的研究与进展(陶黎明);(4)半纤维素酶与长三角的食品、饲料、造纸、环保产业(余世袁);(5)重要代谢产物发酵过程的优化技术(陈坚);(6)清洁生产与污染物的源头控制(毛忠贵)。

会议联系方式:江苏省生物技术协会地址:南京市锁金村77号,邮政编码:210042,电话/传真:025-85410344,联系人:蒋福龙、张青,网址:www.biotech.net.cn,mail:swjs@ms.sti.js.cn。