

mRNA 差异显示技术及其在作物中的应用

高双成, 王世华, 孔祥生, 史国安, 黄华 (河南科技大学农学院, 河南洛阳 471003)

摘要 归纳 mRNA 差异显示 PCR 技术的基本原理及优化、优点与不足, 综述该方法在作物的发育分化、激素调控、抗逆性等方面所取得的研究成果, 并对其的应用前景进行分析。

关键词 mRNA 差异显示; 发育分化; 激素; 抗逆性

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)31-09861-02

mRNA Differential Display Technology and Its Application in Crops

GAO Shuang-cheng et al (College of Agronomy, Henan University of Science & Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract The basic principle of mRNA differential display PCR technology and its optimization, advantages and disadvantages were sum up. The achieved research results by using this method were summarized from the aspects of crop development and differentiation, hormone regulation, and the resistance. And its application prospect was analyzed.

Key words mRNA differential display; Development and differentiation; Hormone; Resistance

基因的选择性表达是生物的一个重要特征, 它决定着生命活动的整个过程, 如生长、发育、衰老和死亡, 这种现象是分子生物学研究中的核心问题。将不同类型或不同状态的组织或细胞内的基因表达情况进行比较, 不但能分析基因的作用方式, 还有可能分离出差异表达的基因, 基于这一原理 Walsh^[1] 将 AP-PCR 技术用于 mRNA 的分析中, Liang 等^[2] 则在此基础上建立了 mRNA 差异显示技术。

1 mRNA 差异显示技术的原理及优化

mRNA 差异显示技术的基本原理是利用大多数成熟 mRNA 在其 3' 端有一长约 200 个碱基的腺嘌呤多核苷序列, 即 poly(A) 尾的特点, 用人工合成的能与之配对的带有 1 个或 2 个选择性碱基的 polyT 引物, 如 T₁₂MN (M 为 A、C 或 G, N 为 A、G、C、T), 即锚定引物进行反转录, 利用 10 碱基的随机引物与相应的锚定引物对反转录得到的 cDNA, 再进行低严谨条件的 PCR 扩增, 通过 DNA 电泳方式将扩增的差异表达片段显示出来, 理论推算, 利用 12 个 3' 端的锚定引物 T₁₂MN 和 20 条 5' 端的随机引物的组合, 可以覆盖大部分的 mRNA (图 1)。为提高分离的准确率、简化对总 RNA 的筛选、降低 PCR 总次数, Liang 等^[3] 用 4 个 3' 简并引物: T₁₁MA, T₁₁MC, T₁₁MG (M 为 A/C/G) 进行反转录和 PCR 反应。这 4 种 3' 端引物将 mRNA 分为 4 类, 引物组合为 80 种。为进一步减少工作量, 1996 年 Liang 改 2 个碱基锚定的 oligo(dT) 引物为 1 个碱基锚定的引物, 既 T₁₁A, T₁₁C, T₁₁G, 且在引物的 5' 端各引入了 1 个 Hnd 酶切位点, 把 5' 端引物降至 8 种, 共 24 种组合。该设计不仅减少了每一种 RNA 样品的反转录数和引物组合数目, 引物的加长也使扩增更为有效, DNA 带型也更加清晰。利用 mRNA 差异显示方法可将不同组织或不同处理材料中差异表达的基因显示出来, 不但为分析基因表达的差异提供了有利的条件, 而且对这些片段克隆分析, 是进一步分离差异表达基因的基础^[4-5]。

2 mRNA 差异显示技术的优点与不足之处

mRNA 差异显示技术是目前筛选差异表达基因的一种有效方法, 该技术自问世以来, 已广泛应用于动物、植物及人类疾病研究的各个领域。mRNA 差异显示技术优点主要

体现在: 可以同时比较多个样品的基因表达; 重复性较好, 同一 mRNA 样品, 用同一组引物扩增的产物显示带重复率大于 95%; 运用了 PCR、聚丙烯酰胺凝胶电泳两种普遍使用的技术, 简单、方便; 灵敏度较高, PCR 扩增后, 一些表达量很低的 mRNA 也能被检测出来。不足之处表现在: 假阳性率很高, 可达 70%, 这是其致命弱点; Northern 筛选步骤还不够完善, 由于最初是直接利用反转录 cDNA 为探针进行 PCR 扩增, 这只能适合于 mRNA 量较多的情况, 而且只适用每条差异带纹只有一种 cDNA 组成的情况, 否则扩增产物便是多种 cDNA 的混合物, 并由于兼并引物倒数第二个碱基的简并使得某些差别带纹不能被检测出来。

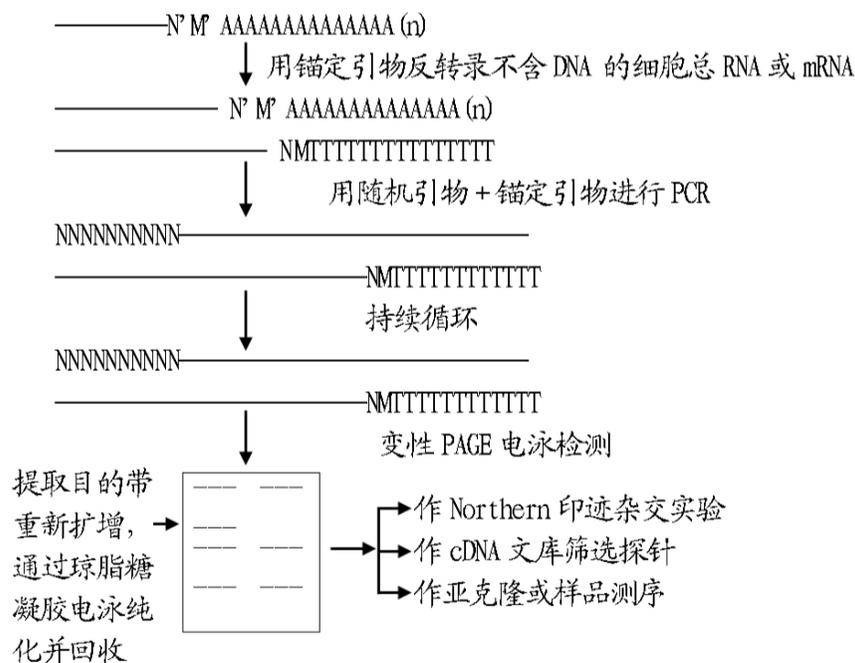


图1 差异显示 mRNA 原理示意

3 mRNA 差异显示技术的应用

3.1 作物的发育分化 高风华等运用 mRNA 差异显示技术, 对水稻滇一型雄性不育系和保持系花药基因表达差异进行了研究, 结果发现只有一对引物 T₈P₁ 组合在 10 对不育系和保持系间扩增出一个共同的差异 cDNA 片段: 保持系在 750 ~ 1 000 bp 有一条带, 而不育系没有对应的带或只是一条很弱的带, 这很可能就是保持系和不育系的育性基因差异表达结果^[6]。Bigam 等^[7] 研究豌豆根尖和界面细胞的 mRNA 和蛋白质的差异表达后指出, 两种细胞的 mRNA 差异与蛋白质差异有高度的相似性, 界面细胞的分化与蛋白表达的变化有关, 利用差异显示技术可以揭示作物根的形态建成。Heck 等^[8] 研究了欧洲油菜的胚发育, 认为有一个重要的基因 Ag115 调控胚发育过程。Northern 杂交和原位杂交

基金项目 河南科技大学人才科学研究基金 (09001163) 资助。

作者简介 高双成 (1976 -), 男, 山西夏县人, 讲师, 从事植物分子生物学研究。

收稿日期 2007-06-07

证明, Ag115 产生的 mRNA 和蛋白早在胚的球形期就开始大量积累, 随后这些蛋白影响胚的发育进程。为了解果实成熟的分子机理。王光清等^[9] 研究了水稻珍汕 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组织 mRNA 的差异表达, 分离鉴定出一组差异表达的 cDNA, 根据命名为 RMI 的 cDNA 片段序列推测的氨基酸序列与已知的蛋白有同源关系。赵大中等^[10] 比较经过春化过和未经春化处理的小麦, 发现春化 20 d 的小麦有一个与春化相关的 cDNA 克隆, 经 Northern 杂交和同源性分析, 证明 VRC54 是春化特异表达的克隆片段, 该克隆片段的基因对春化需求型小麦的成花诱导起重要作用。张晓红等^[11] 比较了玉米胚芽和胚根中特异表达的 cDNA 片段, 经反向 Northern 方法验证, 得到在胚芽中表达而在胚根中不表达有 11 个 cDNA 片段, 在胚芽中的表达量高于在胚根中表达的有 16 个 cDNA 片段。

3.2 作物激素相关基因调控 在作物的发育过程中, 激素自始至终起作用, 调控着作物的器官形成、生长发育等。Chen 等^[12] 通过该方法发现用赤霉素处理的水稻幼苗中 mRNA 有特异表达谱带(UBC gene)。克隆此片段, 发现它影响基因调控过程中的某些蛋白。瞬时表达分析表明, 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 UBC gene 可促进 - 淀粉酶基因表达, 从而调节水稻幼苗发育。王光清等^[13] 以苗期水稻为材料, 对基因表达量与 GA 浓度的关系做了相应研究。Appleyard 等(1995) 以水稻恶苗病(*Gibberella fujikuroi*) 真菌为试验系统, 探讨次生代谢物赤霉素的变化, 结果表明, 在赤霉素代谢的各个时期, mRNA 表达不一样, 其中有 16 个 cDNA 片段与赤霉素合成有关。利用基因诱变法进一步验证, 确定这 16 个基因与赤霉素的合成相关。这个试验表明, 利用差异显示法可以分离一些编码次生代谢物生物合成途径中酶的基因, 研究次生代谢的调控。姜沂春等^[14] 研究了水稻叶绿体 ATP 合成酶受赤霉素诱导的差异表达, 证明赤霉素诱导水稻产生的生理反应过程涉及到叶绿体基因表达。

3.3 作物遗传背景及杂种优势形成机理 程宁辉等^[15-16] 用差异显示技术分别分析了玉米和水稻杂种一代与亲本基因的表达差异, 结果发现, 存在杂种特异、超亲、沉默等多种基因表达类型。胡建广^[17] 在比较了玉米杂种一代及亲本苗期基因表达产物 mRNA 差异的基础上, 分离并鉴定出一个玉米杂种一代超亲表达的 cDNA, 并以该 cDNA 克隆为探针筛选到一个全长的 cDNA 克隆(ZHO1)。Xiong 等^[18] 报道单基因沉默型与杂种优势及杂合性呈正相关。倪中福^[19]、吴利民^[20] 等也进行了有关研究。

3.4 作物抗性研究 作物病害每年都使农作物受到大量损失, 因此提高农作物的抗病能力不仅有利于减少损失, 而且有利于减少农药使用 and 环境污染。目前研究作物抗病机理的主要方法是探讨作物—微生物的相互作用机制。刘永军等^[21] 利用差异显示法研究小麦盐胁迫的抗性机理, 发现 4 个差异片段只在盐胁迫的小麦耐盐品系(宝丰 7228) 基因组中表达, 而在对照中没有出现。4 个差异片段经杂交显示, 只有一个片段(ts04) 存在明显差异, 其余 3 个不存在明显差异。王洁等^[22] 以水稻品种 JG30 和 CBB23 为材料研究抗、感利用近等基因系白叶枯病菌前后基因表达的差异, 分离得到了一个受白叶枯病菌诱导表达的片段。Jacobs^[23] 把

一部分马铃薯进行冷处理, 而另一部分不处理, 然后比较两者的 mRNA 表达情况。结果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。这说明作物本身在遇到低温时, 会产生一些应激反应, 以抵挡低温危害。张立平等^[24] 比较了水稻对铝敏感品种(pp2464-11) 和抗性品种(Pedel), 共发现 25 个差别 cDNA, 他们推测抗性品种特异表达的片段可能与合成抗性蛋白有关, 敏感品种基因的特异表达可能产生一些毒害蛋白, 抑制水稻根的生长。周建明等^[25] 应用差异显示分离得到水分胁迫诱导表达的小麦基因 dil 的 cDNA 片段, 并通过 Northern blot 研究了 dil 基因与水分胁迫时间的关系。

4 展望

综上所述, 利用 mRNA 差异显示技术为选育高抗逆性、抗病性的作物品种提供了很多重要的基因, 在鉴定、筛选和克隆与作物抗逆、抗病相关基因方面显示了巨大而独特的作用。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 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。随着对该技术的改进和新方法的出现, 将会有更好的应用前景。

参考文献

- [1] WELSH J, CHADA K, DALAL S S, et al. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA[J]. *Nucl Acid Res*, 1992, 19(20): 4965-4970.
- [2] LIANG P, PARDEE A D. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. *Science*, 1992, 257: 967-971.
- [3] LIANG P, AVERBOUKH 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.
- [4] 孙涛, 刘雪丰. 运用差异显示分离特异性表达的基因[J]. *生物化学与生物工程进展*, 1996, 23(4): 316-318.
- [5] 徐国恒, 凌雁, 梁德勇, 等. 银染 mRNA 差异显示方法的建立和吗啡诱导基因的克隆[J]. *北京医科大学学报*, 1998, 30(5): 385-388.
- [6] 高风华, 谭学林. 水稻滇一型不育系及保持系花药 mRNA 差异显示[J]. *云南农业大学学报*, 2006(2): 150-153.
- [7] BRUGHAM L A, WOO H H, NICOLLS M. Differential expression of protein and mRNAs from border cells and root tips of pea[J]. *Hort Physiol*, 1995, 109: 457-463.
- [8] HECK G R, PERRY S E, NICHOLS K W. AG115, a MAD3 domain protein expressed in developing embryos[J]. *Hort Cell*, 1995, 7(8): 1271-1282.
- [9] 王光清, 胡建广, 杨金水, 等. 水稻愈伤组织形态发生中的 MAD3 盒基因的差异表达[J]. *植物学报*, 1997, 9(11): 1035-1041.
- [10] 赵大中, 陈民, 种康. 运用差异显示法分离冬小麦春化作用相关 cDNA 克隆[J]. *科学通报*, 1998, 43(9): 965-968.
- [11] 张晓红, 王国英, 胡剑, 等. 玉米幼苗胚根和胚芽基因表达的差异及差异条带的克隆[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(4): 345-348.
- [12] CHENXF, WANG BY, WUR. A gibberellin stimulated ubiquitin conjugating enzyme gene is involved in alpha amylase gene expression in rice aleurone[J]. *Hort Mol Biol*, 1995, 29(4): 787-795.
- [13] 王光清, 严成其. 差异显示法分离赤霉素调控的水稻 cDNA[J]. *实验生物学报*, 1997, 30(1): 21-26.
- [14] 姜沂春, 董海涛, 李德葆. 水稻叶绿体 ATP 合成酶基因转录丰度受赤霉素诱导调节[J]. *中国水稻科学*, 2001, 15(1): 17-20.
- [15] 程宁辉, 高燕萍, 杨金水, 等. 玉米杂交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.
- [16] 程宁辉, 高燕萍, 杨金水, 等. 水稻杂交一代与亲本幼苗基因表达差异的分析[J]. *植物学报*, 1997, 39(4): 379-382.
- [17] 胡建广, 赵相山, 杨金水, 等. 一个编码玉米转译起始因子新基因的克隆[J]. *科学通报*, 1998, 43(2): 190-194.

(上接第9862 页)

- [18] XIONG L Z, YANG G P, XU C G, et al . Relationships of differential gene expressed in leaves with heterosis and heterozygosity in a rice diallel cross[J] . *Molecular Breeding*,1998 ,4 :129 - 136 .
- [19] 倪中福,孙其信,吴利民. 普通小麦不同优势杂交种及其亲本之间基因表达差异比较研究[J] . 中国农业大学学报,2000 ,5(1) :1 - 8 .
- [20] 吴利民,倪中福,王章奎,等. 小麦杂种及其亲本苗期叶片家族基因差异表达及其与杂种优势关系的初步研究[J] . 遗传学报,2001 ,28(3) :256 - 266 .
- [21] 刘永军,景建洲,贾敬芬,等. 用 mRNA 差异显示技术分离盐胁迫

下小麦耐盐相关cDNA[J] . 西北大学学报,2006 ,36(1) :89 - 92 .

- [22] 王洁,王春连,樊金娟,等. 用 mRNA 差异显示技术分离水稻抗白叶枯病相关基因[J] . 作物学报,2005 ,31(10) :1373 - 1376 .
- [23] JACOBS A. Molecular analysis of cold resistance in chilean potato species . A minor field study. Working paper international rural development center [J] . *Swedish University of Agriculture Science* , 1996 ,305 :15 .
- [24] 张立平,吴平,祝全明. 利用 DD 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 .
- [25] 周建明,朱群,白永延,等. 水分胁迫诱导表达的小麦基因的cDNA 片段克隆和序列分析[J] . 科学通报,1998 ,43(22) :2419 - 2422 .