

文章编号:1003-8701(2004)02-0009-04

分离基因的有效手段—mRNA 差异显示技术

邢少辰,林秀峰

(吉林省农科院生物技术研究中心,吉林 公主岭 136100)

摘要: mRNA 差异显示技术从开始应用至今已经有 10 年了。在此期间,此项技术也在不断发展完善。简要综述了差异显示技术的基本原理、优越性、存在的主要缺陷及其技术改进等方面的研究进展。

关键词: 差异显示;基因;进展

中图分类号: Q786

文献标识码: A

1 前言

高等生物中大约有 5~10 万个不同的基因,但是,任何一个细胞中同时表达的基因仅约占总数的 15%。这些基因在生物生长发育的各个阶段起着不同的作用,决定了整个生命过程,包括发育与分化、对逆境的反应、细胞周期调控、衰老乃至程序化死亡。

Liang 和 Pardee 于 1992 年以研究与癌症发生有关的基因为目的,创立了一种鉴定与克隆哺乳动物正常生理状态与异常状态细胞之间差异表达的基因方法,即 mRNA 差异显示技术(mRNA differential display)^[1]。自创立以来,迅速得到学术界的认同,在动物、植物的基因克隆当中广泛应用,发挥了巨大的作用^[2~8]。

2 差异显示技术的原理

基因表达要经过转录和翻译两个过程,即 DNA-RNA-蛋白质的过程。表达的差异归根到底是 mRNA 序列的差异。研究发现,真核细胞中绝大多数成熟的 mRNA 的 3'端均有多聚腺苷酸尾巴,即 poly(A)尾巴。因而可以设计 oligo(dT)与 poly(A)配对,并外加两个针对相邻的 12 组碱基的配对碱基,这样共 12 组引物(即 GG GC GT GA CC CG CA CT TT TG TC TA),称为锚定引物,每组引物理论上可以锚定总 mRNA 当中特定的 1/12,如 T₁₂GC 仅识别一类紧靠 Poly(A)上游有 CG 序列的 mRNA。这些锚定引物与 mRNA 3'端锚定后,在逆转录酶作用下,逆转录合成与 mRNA 链互补的 cDNA 的第一链。这样,12 组锚定引物就可以把总 mRNA 的群体全部逆转录成 cDNA,然后加入 5'端随机引物,经变性后,以 cDNA 第一链为模板,经过低温复性,形成任意引物与 cDNA 第一链配对,在 Tag 酶作用下进行 cDNA 第二链的合成。最后在上述两种引物的共同引导下,进行 PCR

收稿日期:2003-10-10

作者简介:邢少辰(1964-),男,吉林省农科院研究员,博士。主要从事植物分子生物学研究。

扩增。因为 5' 端引物在 cDNA 链上的结合部位是随机的, 所以不同的 mRNA 扩增产物有长有短, 经电泳分离, 通过放射自显影、荧光显色或者银染等方法检测, 就可以得到 mRNA 的指纹图谱。把两种或两种以上不同细胞的指纹图比较即可得到基因的差异表达。将这些差异表达的 cDNA 条带从凝胶中回收, 作为模板进行第 2 次扩增, 再次回收纯化, 经 Northern blot 排除假阳性后可进一步转化、克隆, 以便最终获得差异表达的目的基因。

3 差异显示技术的基本方法

3.1 引物

由于差异显示要用 PCR 扩增, 所以两个引物是必不可少的。和一般的 PCR 扩增不同的是, 一个引物叫锚定引物, 另一个叫随机引物。在引物的长度上, 如果用引物太短(如 10 bp)会造成高比例的假阳性, 而长的引物(如 20 bp), 再配合使用高浓度的 dNTP、热启动 PCR 和精确度高的 DNA 聚合酶等, 会大大改善这种状况, 取得很好的差异显示结果^[9]。

3.2 RNA 的提取

从理论上讲, 差异显示技术用的是 mRNA, 但是 mRNA 的分离比较烦琐, 而且由于它极易分解, 所以在分离的过程中就增加了污染的几率。实验证明, 用总 RNA 来代替 mRNA 是完全可行的, 同时还减少了时间和费用。对 RNA 提取过程无特殊要求, 有多种方法可以得到 RNA, 目前使用较普遍的有酸性胍-酚-氯仿法和热酚法等。使用市售 RNazol 试剂则更为方便。需要指出的是, 清除 DNA 污染很重要, 可先用 LiCl 洗涤, 而后用无 RNase 的 DNase 处理, 也可以在 RNA 提取过程中直接加入 DNase I。

3.3 逆转录过程和 PCR 扩增

逆转录是指在逆转录酶的作用下, 以 mRNA 为模板, 逆转录成 cDNA。一般来讲, 在正式逆转录之前, 首先在 68℃ 条件下破坏 RNA 可能存在的二级结构。然后短暂退火, 42℃ 条件下逆转录 50~60 min。逆转录完成后, 在 95℃ 的条件下保持 5 min, 目的是让逆转录酶失活。逆转录后, 在 Tag 酶催化下 PCR 扩增合成 cDNA 的第二链。

3.4 差异片段第 2 次扩增

上述 PCR 产物经 4.5%~6.0% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 电泳后经银染显影或荧光显影, 找出差异带, 切下后转入干净的小离心管中, 加入相同引物、dNTPs, 再扩增 30~35 个循环。扩增后用琼脂糖凝胶电泳分离, 回收保存。

3.5 阳性鉴定

筛选出的差异带是否是真正的差异, 即差异片段是否真正来源于样品, 而不是由于设计和操作等方面的失误造成的, 及序列是什么等, 必须经过鉴定予以明确。目前通常是先克隆进入载体, 而后制成探针, 进行 Northern 杂交和测序, 也可以直接测序。但有一个问题是, 如果不是单一片段, 直接测序会出现不太尽人意的结果^[10]。如证实为新基因, 可以通过基因库调出全序列, 了解其性质, 还可以表达出产物, 免疫动物, 制成抗体进行免疫反应, 也可以原位杂交了解组织或细胞内分布, 以进一步探讨其功能和意义。

4 差异显示技术的优缺点

差异显示技术与示差筛选、扣除杂交相比, 具有很多优点^[11]: ①速度快, 较易操作;

②由于 PCR 扩增技术的应用,使得低丰度 mRNA 的鉴定成为可能,理论上只要有一个模板可以扩增;③灵敏度高,需要的样品少;④可同时比较两种以上不同来源的 mRNA 样品间基因表达的差异。

此项技术也有一些明显的不足,主要表现在:①出现差别条带太多,假阳性率高达 70%左右,严重地干扰试验结果,使后续工作大量增加。所谓假阳性指克隆的 DNA 片段用 Northern 杂交时,没有阳性信号^[12]。②重复性差。③对高拷贝数的 mRNA 具很强的倾向性;cDNA 扩增产物的量不仅取决于 mRNA 的丰度,也取决于引物与模板之间的特定匹配情况。这样,即使是高丰度 mRNA,由于随机引物与之匹配不合适,其扩增产物的量将少于用丰度虽低,但与引物匹配良好的模板扩出的量,因此,往往导致对基因表达差异的错误认识。④扩增条带分子长度较短,一般在 110~450 bp 之间^[13]。

5 克服缺点的办法

首先,要有高质量的总 RNA。本方法是 mRNA 为模板进行逆转录。但实验证明,以总 RNA 为模板的效果也非常好,而且省去了 mRNA 的分离,减少了中间环节和污染的机会,节约了经费和时间。高质量的总 RNA 包括两个方面,一是要保证 RNA 的完整性;二是不受 DNA 的污染,否则,在 PCR 扩增过程中,优先扩增 DNA,造成假阳性。提取的 RNA 要用无 RNase 的 Dnase I 消化,去除痕量的 DNA 污染。对此,可以在实验中设立一个不加逆转录酶的反应来检验 DNA 是否去除干净。

第二,改进引物。Liang 和 Pardee 在开始设计 mRNA 差异显示的引物时,其 5'端为 10 个碱基的随机引物,3'端为 $T_{11}MN$ ($M=A,C,G, N=A,C,G,T$)的锚定引物,有 12 个组合,后又将 3'端改为 $T_{11}M$ ($M=A,C,G$),工作量大大减少。引进酶切位点是另一个思路,酶切之后和特异合成的接头连接后进行扩增,其原理与 AFLP 相同^[14]。此外,针对一些基因家族的保守序列,可以设计特异的专一性引物进行扩增,结果表明,该法灵敏而又可靠,但前提要事先知道目的序列^[15]。

第三,降低 dNTP 浓度。如 dNTP 浓度过高,一是降低扩增的特异性,二是不利于同位素的掺入。因为高浓度 dNTPs 往往导致非目标位点(识别序列)的错配以及延伸过程中 dNTPs 的错误掺入,降低了扩增的忠实性和专一性。

第四,选择合适的反转录温度。通常在 37~48℃进行反转录,如采用 $T_{11}MN$ 作为反转录引物,可采用 42℃。较低的温度有利于反转录引物和模板的配对,但模板的二级结构不易解开,从而造成 cDNA 第一链偏短。可以采用两段式温度来解决这个问题,即先在 42℃反转录 30 min,再在 48℃反转录 30 min,这样有利于解开模板的二级结构,合成成长的 cDNA。

第五,设立重复对照。这里设立重复对照有两层含义,一是利用不同的逆转录酶进行平行实验;二是同一逆转录产物做两次平行 PCR 扩增,如电泳后两平行管的 cDNA 带型和数目都一致,则表明 DNA 聚合酶的质量符合要求,选取两个反应均同时出现的差异带,可显著降低假阳性率。

第六,其它方面的改进:①注意加样时的误差,对于相同的试剂可以统一混合(core mix),降低误差;②用统一的 PCR 管,实验证明,管壁薄厚不同会造成结果不同。其原因尚不清楚^[16];③用非同位素的方法代替同位素。罗青等^[17]用非同位素的方法分析鼠甲状腺激素的反应基因,取得了很好的效果;④用琼脂糖代替聚丙烯酰胺^[18],但是在用琼脂

糖代替聚丙烯酰胺电泳时,分辨率会有所降低,有时看起来是一条带,实际上包含两条甚至两条以上的带,针对这个问题,最好的办法是把片段克隆到载体上,然后提取质粒 DNA,再制成探针,可以保证是单一的片段;⑤差异显示一般得到的片段较小,不是真正差异表达的基因。为了得到全长的基因,有两个方法,一是采用 cDNA 为探针从 cDNA 文库中筛选,二是 RACE(cDNA 末端快速扩增)的方法;⑥用加长的引物可以获得从 150 bp~2 kb 的片段,同时还可以减少假阳性,提高低丰度 mRNA 的检测灵敏度^[19]。

6 我们的工作

经过不断地探索与改进,现在用改进的方法,可以获得长达 1.5 kb 左右的 cDNA 片段,说明这个方法经过优化后完全可以克服获得片段较短的缺点,克隆出完整的基因。例如我们用干旱处理的栽培大豆材料中,得到一个长达近 1 kb 的片段,分离出来后,连接到 T-载体上,测序后得长度 970 bp。在 GneBank 中 BLAST 后,和干旱有密切关系的基因 MAT9 的符合率达到 99%。另外还得到一批不同的差异片段,进一步的工作正在进行中。

为了纪念这个技术发明 10 周年,2002 年 10 月中旬,来自世界各地的 150 多名专家学者在美国范德比尔特大学(Vanderbilt University)举行了“2002 差异基因表达”研讨会,全面总结了这项技术的应用情况,其中也包括在农业领域的应用。尽管这项技术受到了其它技术的挑战,如 cDNA 芯片,但它的优势是非常明显的。正如它的发明人之一 Liang 所说的,芯片技术是一个“封闭的体系”,它只能检测到放在介质上的片段,而差异显示则是一个“开放的体系”,可以检测到新基因。我们相信,随着条件不断优化,mRNA 差异显示将会得到越来越广泛地应用。

参考文献:

- [1] Liang P, Pardee A B, et al. Differential display of eucaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257: 967-971.
- [2] Cmarik J L, Min H, Hegamyer G, et al. Differentially expressed protein Pdcd4 inhibits tumor promoter-induced neoplastic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA . 1999, 96: 14037-14042.
- [3] 陈朝晖. mRNA 差异显示技术及其在前列腺癌中的应用现状[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2002, 22(1): 51-55.
- [4] 王光平,等. 应用信使核糖核酸差异显示研究中医肝阳上亢、肝阳化风证的基因表达[J]. 湖南中医学院学报, 2001, 21(1): 6-8.
- [5] 黄 旭,等. mRNA 差异显示法分离水稻抗稻瘟病相关 cDNA 克隆[J]. 江苏农业科学, 2000, 16(2): 124-126.
- [6] Park J M, Park C J, Lee S B, Ham B K, et al. Overexpression of the Tobacco Tsi1 Gene Encoding an EREBP/AP2-Type Transcription Factor Enhances Resistance against Pathogen Attack and Osmotic Stress in Tobacco, The Plant Cell, 2001, 13, 1035-1046.
- [7] 张立平,等. 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.
- [8] 赵大中,等. 运用差异显示法分离小麦春化相关 cDNA 克隆[J]. 科学通报, 1998, 43(9): 964-968.
- [9] Matz M and Lukyanov S A. Different strategies of differential display: areas of application. Nucleic Acids Res., 1998, 26 (24): 5537-5543.
- [10] 郝纯毅,等. 降低 mRNA 差异显示技术假阳性率的一种方法[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18(1): 110-114.
- [11] 邓洪新,等. 植物基因克隆的策略和方法[J]. 南农业学报, 2001, 14(3): 78-82.
- [12] Miele G, MacRae L, McBride D, et al. Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. Biotechniques, 1998, 25(1): 138-144.

质也有一定的提高。生产中一定要合理使用浓度,一般使用浓度为 5‰~10‰。

参考文献:

[1] 南京农学院. 田间试验和统计方法[M]. 北京:农业出版社,1985 .
[2] 何钟佩,等. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京农业大学出版社,1992 .
[3] 王 阳,等. 块根茎膨大素和多效唑对马铃薯的效应[J]. 中国农学通报,1998,3:56 .
[4] 董 然,等. 喷施叶面处理剂对万寿菊育苗效果及产量影响的研究[J]. 吉林农业大学学报,2001,23(5):24-25.

Study on the Effect of Duoxiaoshudaosu on Rice
Seedling Character and Yield

ZHOU Lan, LIU Yu-lan, CHEN Kai-feng, et al.

(College of Agricultural Technology, Beihua University, Jilin 132101, China)

Abstract: Effect of Duoxiaoshudaosu on rice seedling character and yield was studied. Results of the experiment showed that spraying of Duoxiaoshudaosu solution at optimum concentration (1%) improved seedling character significantly and increased yield of rice by 8.0% compared with the control. Spraying at very high concentration inhibited the growth of rice seedling and caused crop loss.

Key words: Rice; Duoxiaoshudaosu; Seedling character; Yield



(上接第 12 页)

[13] Jurecic R, Nachtman R G, Colicos S M, et al. Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. Anal. Biochem. 1998, 259(2): 235-244.
[14] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn SM, et al. 1996, Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development, plant J., 9, 745-753.
[15] Lievens S, Goormachtig S and Holsters M. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward. Nucleic Acids Res., 2001, 29(17): 3459-3468.
[16] Liang P. Factors ensuring successful use of differential display. Methods, 1998, 16: 361-364.
[17] 苏 青,等. 非同位素 mRNA 差异显示方法的建立及应用[J]. 上海第二医科大学学报,2000,20(5):405-407 .
[18] Soklov B P, Prockop D J. A rapid and simply PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes, Nucleic Acids Res, 1994, 22 (9): 4009-4015.
[19] Callard D, Lescure B and Mazzolini L. 1994, A method for the elimination of false positives generated by the mRNA differential display technique, Biotechniques, 16: 1096-1103.

DD-PCR, an Effective Way to Isolate New Genes

XING Shao-chen and LIN Xiu-feng

(Bio-technology Research center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province,
Gongzhuling 136100, China)

Abstract: It has been ten years since the invention of mRNA DD-PCR technique. As time passed, this technique was developed and improved continuously. The basic principle, advantages and problems of this technique were reviewed in the paper. Related studies were also informed.

Key words: Differential display; Gene; Development