

抑制消减杂交技术及其在植物基因表达研究中的应用

董霞^{1,2} 李文正^{3,*} 刘世贵²

¹ 云南农业大学东方蜜蜂研究所, 昆明 6502013; ² 四川大学生命科学学院, 成都 610064; ³ 云南省烟草科学研究所, 云南玉溪653100

Suppression Subtractive Hybridization Technique and Its Application in Gene Expressing of Plant

DONG Xia^{1,2}, LI Wen-Zheng^{3,*}, LIU Shi-Gui²

¹Eastern Bee Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; ²College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; ³Yunnan Tobacco Science Research Institute, Yuxi, Yunnan 653100, China

摘要 抑制消减杂交技术以其低假阳性率、高灵敏度等优点, 越来越多地应用于植物不同发育阶段、植物突变体、不同外界因素即非生物因素和生物因素造成植物基因差异表达的研究。文章就此领域的研究进展作介绍。

关键词 抑制消减杂交(SSH); 植物; 基因差异表达

基因是细胞的遗传物质, 决定细胞的生物学性状。细胞的生物学功能最终是由大量的基因表达产物即蛋白质完成的。基因表达是一个复杂而精细的网络调控过程, 其变化是调控细胞生命活动过程的核心机制。高等真核生物约含有 10 万个不同基因, 但在生物体的发育过程中只有 15% 的基因得以表达, 而这大约有 15 000 个基因的表达是按时间和空间顺序有序地进行的, 此种表达方式即为基因的差别表达(differential expression)。植物在不同生长发育阶段的不同类型细胞中基因的表达具有一定的差异性(Liang和Pardee 1992), 当植物受到外界因素影响时, 基因表达也会发生不同程度的改变。比较不同细胞、不同基因型、不同外界条件下基因表达上的差异, 是研究生命过程分子机制的基础和分离克隆目的基因的前提, 而明确植物不同类型的细胞在特定内因或外因条件下的基因表达及其调控过程, 将对人类控制或改变其生理与病理状态提供一定的帮助。

1 植物差异表达基因相关的研究技术

(1) 差异显示PCR (differential display PCR, DD-PCR) 是应用特定引物对目的 mRNA 进行反转录, 电泳后找出差异条带(Liang和Pardee 1992)。此技术简单、快速、灵敏度高、RNA 用量少(0.2~2 μg)、可同时比较两组以上的样品, 但存在假阳性率高, 一般大于 70% 和反转录获得的 DNA 绝

大部分仅是 mRNA 3' 端的非翻译区, 给鉴定带来困难(Bertioli 等 1995; Sompayrac 等 1995)。

(2) cDNA 代表性示差分析技术(cDNA-representational difference analysis, cDNA-RDA) 是在 Lisitsyn 等(1993) 的基因组 DNA 示差分析技术基础上经 Hubank 和 Schatz (1994) 改进的方法, 其特点是将 PCR 技术与差减杂交技术相结合, 通过 PCR 作用选择性扩增目的片段。此技术有更高的富集效率, 得到的可以扩增的 cDNA 代表着全基因组的信息, 假阳性率低; 但存在富集片段短, 检出低丰度 mRNA 受限的缺陷。

(3) RNA 指纹技术(RNA fingerprinting) 是由 Welsh 等(1992) 建立的与 DDRT-PCR 相似的方法, 但克服了其只能获得 mRNA 3' 端序列缺陷, 并有可能得到 cDNA 中段的差异表达序列片段, 从而可获得全长的 cDNA。

(4) 基因系列表达分析(serial analysis of gene expression, SAGE) (Velculescu 等 1995) 是能单独鉴别 1 个转录子的核苷酸序列标签和连接短序列标签对其进行克隆鉴定, 能对大量转录子进行分析的技术, 但难于用于两两差异表达基因的分析。

收稿 2005-11-24 修定 2006-05-15

资助 国家自然科学基金(30560062) 和云南省烟草公司项目(03A01、0515)。

* 通讯作者(E-mail: lwz67@163.com, Tel: 0877-2056548)。

(5) cDNA微阵列(DNA microarray或gene chip) (Schena等1995)技术可将cDNA文库中的序列分离固定于支持物上,同时检测比较样品中众多序列的表达情况和分析基因表达谱,有可自动、定量、快速检测目的材料中上万个基因的表达情况等优点,但也存在费用高昂、工作量大、会有假阳性结果出现等缺陷。

尽管上述方法均有各自的优缺点,但总的来说筛选差异表达基因的方法已从既费时又费力的方法(如聚丙烯酰胺凝胶为基础的差异显示)发展到自动高通量检测方法(如DNA微阵列)。消减杂交(subtractive hybridization, SH)是一种富集差异表达基因的有效方法(Wan等1996),但因为需要大量的mRNA进行杂交,杂交后的微量cDNA进行克隆亦较困难,所以Duguid和Dinauer(1990)在cDNA后加上接头,即可以进行选择性PCR扩增。为了克服基因上调表达造成的不良后果,Diatchenko等(1996)又进一步改进了抑制性杂交PCR技术,提出一种克隆基因的新方法——抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH),经过几轮循环可以将差异表达基因扩增1 000倍。

2 SSH的原理

SSH是抑制PCR与差减杂交技术相结合的更为简单而快速的分离差异基因的方法。此方法运用了杂交二级动力学原理,即丰度高的单链DNA在退火时产生同源杂交的速度快于丰度低的单链DNA,从而使原来在丰度上有差别的单链DNA相对含量基本达到一致。而抑制PCR则是利用链内退火优于链间退火的特点,使非目的序列片段两端反向重复序列在退火时产生类似发卡的互补结构,无法作为模板与引物配对从而选择性地抑制非目的基因片段的扩增。这样既利用了差减杂交技术的差减富集,又利用了抑制PCR技术进行了高效率的动力学富集(刁丰秋1998;陆秋恒和罗志勇2001)。其基本步骤为:提取2种不同细胞的mRNA为驱动组(driver)和检测组(tester),反转录成cDNA,分别用同一种识别四碱基序列的限制酶如*Rsa*I消化,以产生大小适当的平头末端cDNA片段,将检测组cDNA分成均等的2份,

各自接上2种接头,与过量的驱动组cDNA变性后退火杂交,第1次杂交后有4种产物:a是单链检测组cDNA,b是自身退火的检测组cDNA双链,c是检测组和驱动组的异源双链,d是驱动组cDNA。第1次杂交的目的是实现检测组单链cDNA均等化(normalization),即使原来有丰度差别的单链cDNA的相对含量达到基本一致,由于检测组cDNA中与驱动组cDNA序列相似的片段大都和驱动组形成异源双链分子c,使检测组cDNA中的差异表达基因的目标cDNA得到大量富集。第1次杂交后,合并2份杂交产物,再加上新的变性驱动组单链,再次退火杂交,此时,只有第1次杂交后经均等化和消减的单链检测组cDNA和驱动组cDNA一起形成各种双链分子。这次杂交进一步富集了差异表达基因的cDNA,产生了一种新的双链分子e,它的2个5'端有2个不同的接头,正由于这2个不同的接头,所以其在以后的PCR中可有效地得到扩增(BD Biosciences Clontech: <http://www.bdbiosciences.com/clontech>)。

虽然SSH技术仍然有一些缺陷,如不能同时比较多个样品;为了保证结果的准确性,杂交样品的遗传背景只在某一方面不同;对RNA来源困难的样品有限制;得到的EST(expressed sequence tags)序列不是全长cDNA(Diatchenko等1996),但由于SSH综合了DD-PCR和cDNA-RDA 2种技术的特点,因此它有2项技术各自的优点,且相应地改进了各自的缺点。SSH技术大大地降低了假阳性率,von Stein(1997)的研究表明其阳性率可达到94%。由于SSH方法所做的均等化和目标片段的富集,使它具有高灵敏度,可以检出DD-PCR和cDNA-RDA中不易被检出的低丰度表达的mRNA。另外,SSH的速度快,效率高,一次SSH反应可以同时分离几十或成百个差异表达基因(陆秋恒和罗志勇2001)。

3 SSH技术在植物研究中的应用

SSH技术构建的cDNA文库中包含大量的EST序列,能高效、快速、大规模地得到差异表达的基因序列片段,从中获得新的cDNA序列,结合RACE、原位杂交等方法获得全长基因。自

1996年报道以来,该技术已广泛应用于分子遗传学和定向克隆的研究中,如鉴别病理变化、不同生物体生长发育和组织分化中的基因表达变化、不同基因型的植物的基因表达变化、外界因素诱导使植物产生差异表达的基因(如机械伤害、胁迫、激素、重金属污染、外源微生物、昆虫)等。

3.1 外界非生物因素引起的植物基因差异表达

3.1.1 外源化学物质的诱导 外源化学物质的诱导会引起植物基因表达的变化。SSH技术是一项有效分离差异表达基因的技术,在植物受到有利化学物质诱导引起基因差异表达及基因克隆有如下研究。Kang等(2003)在水杨酸(salicylic acid, SA)诱导的拟南芥超量表达株系cDNA中,采用SSH技术克隆到OBF-binding protein 3 (OBP3)应答基因(ORGs),其中ORG1和ORG4是新基因,ORG5是伸展蛋白基因,ORG4在数据库中无同源蛋白,ORG1与细胞分裂调控因子和原纤维蛋白只有极低的同源性。ORG2和ORG3的氨基酸序列有80%的同源性并含有一个碱性螺旋-环-螺旋DNA结合区,提示ORG2和ORG3可能是转录因子。ORG1、ORG2、ORG3均受SA诱导上调表达,而茉莉酸(jasmonic acid, JA)则诱导下调表达,SA不仅在植物防御中起作用,还能提高植物抵抗非生物胁迫的能力(王利军等2002)。以环割2年的橡胶树(*Hevea brasiliensis*)无性系7-33-97为材料,曾日中等(2003)构建了外源JA刺激下橡胶树胶乳与未处理橡胶树胶乳差异表达的cDNA消减文库。他们随机选取25个阳性克隆进行测序,在其中10条EST片段中可找到碱基序列相似性大于80%以上的同源基因序列,其余15条EST为没有任何功能线索的未知序列。此项研究为开展以JA调控橡胶树胶乳代谢和橡胶生物合成的分子机制研究建立了基础。Verica等(2004)在可可树(*Theobroma cacao*L.)受苯并噻二唑(benzothiadiazole, BTH)、表面活性剂Silwet-L77、甲基茉莉酸(methyl jasmonate, MeJA)诱导的SSH文库中,用微阵列杂交分析、高通量测序和生物信息分析确定有无信号分子诱导的基因,并分离得到1256个克隆,其中有330个代表可可叶防御激发表达的

基因。Wang等(2002)用硝酸盐处理水稻(*Oryza sativa*),经反转录得到cDNA,通过正向和反向筛选确定了37个已知基因和55个新基因在供给硝酸盐的根中有较强的上调表达,此种已知基因涉及氮的吸收同化、糖的运输和有机酸代谢、信号与传导、蛋白质合成与分解、植物防御、激素代谢和细胞分裂。大多数基因在供给硝酸盐的根中表达比缺少硝酸盐的根强烈,说明硝酸盐可能调控这些基因的表达。Chen等(2002)从三十烷醇诱导水稻的SSH文库中分离到受其调控的基因,测序结果显示,多数上调基因编码光合和光修复蛋白,2个下调基因编码ABA和与胁迫相关蛋白及机械伤害相关的蛋白,说明三十烷醇能增强光合作用,削弱胁迫因素的影响。为了研究植物保护剂(safener)的分子机制,Rishi等(2004)构建了由除草剂保护剂Concep-III诱导的杂交杨树(*Populus nigra* × *P. maximowiczii*)的SSH文库,分离鉴定到Concep-III诱导引起差异表达的基因,它们编码保护剂所作用的不同阶段的蛋白:氧化、结合、淬灭,同时还发现新的可能与除草剂解毒、耐受相关的基因。

3.1.2 外界胁迫的影响 植物在不良环境条件影响下,基因表达会发生一系列的变化,最终导致植物体内生理生化的反应,以应答逆境的胁迫。在不同逆境因子所导致的不同植物的基因差异表达中,可得到抗逆境胁迫的特异表达基因。

植物受到水分胁迫时能作出多种抗逆性反应,除气孔关闭和蒸腾下降外,还有渗透调节能力和抗氧化能力均提高,并产生抗逆蛋白和合成ABA等,有的反应需要基因表达实现(杨洪强等2001)。为了研究水分胁迫引起基因表达的变化,Zheng等(2004)用SSH和cDNA微阵列技术分离了玉米(*Zea mays*)苗受水分胁迫诱导的基因,分析了960个克隆。通过对差减cDNA文库的筛选,确定了533个克隆是受水分诱导表达的,测序后经聚类分析和BLAST比对,得到190个特殊的EST序列。王转等(2003)以抗旱小麦品种‘旱选10号’(‘晋麦5号’)为实验材料,水培的幼苗长至一叶一心后,将其放在20℃生长箱中水培48h的

作为驱动组,以PEG-6000水溶液胁迫培养48 h的作为检测组进行抑制差减杂,以正向和反向差减杂交后的cDNA为探针筛选SSH文库,测序后获得不重复的EST序列101个。Jiang等(2004)从400个重组克隆中筛选到21个在甘露醇渗透胁迫下的梭梭草(*Haloxylon ammodendron*)差异表达的cDNA序列,有2个序列可能是与干旱相关的新基因。Sahr等(2005)报道在73个拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)受重金属铈胁迫差异表达的基因中大部分是防御、解毒、运输、平衡和基础代谢的蛋白质,以及控制转录和翻译的蛋白质。Liao等(2003)在用SSH技术构建大豆(*Glycine max* L. Merr.和*G. soja*) NaCl胁迫文库的基础上,结合RACE(5' and 3' rapid amplification of cDNA ends),克隆到1个新的基因,即*Glycine max purple acid phosphatase-like*基因(*GmPAP3*),通过分子克隆、多基因分析和基因表达差异研究的结果表明该基因的生理功能与大豆适应NaCl胁迫有关。Watt(2003)对氧化胁迫下甘蔗(*Saccharum* spp.与cv. N19杂交)铝应答基因的鉴定和表达分析所得到的50个上调表达的cDNA序列中,有14个参与环境信号传递和基因表达调控,28个的功能未知。

Cho等(2004)所分离的水稻(*Oryza minuta*)受到机械损伤(针扎)的差异表达基因,其主要参与亚细胞定位、代谢、细胞保卫和防御、转录等生理活动,这些与抗性相关的EST序列可用于水稻野生品种防御机制的研究,并可能会为研究改进栽培稻种质提供新的途径。Banh等(2001)从冷处理的大麦(*Hordeum vulgare* L.)的SSH文库中分离到大量的低温诱导基因,获得160个大麦低温诱导(barley low temperature-induced, *blti*) cDNA克隆。Northern杂交分析表明,有的*blti*克隆在受到低温、NaCl、脱水和ABA处理时呈现表达差异;其中有一个944个核苷组成的具有开放阅读框的全长cDNA序列*blti2*,它的492个核苷编码164个氨基酸。分析核苷酸序列,没有找到*blti2*的同源基因;而所推导的氨基酸序列表明,*blti2*含有3个跨膜区,这说明*blti2*是一个新的受低温诱导的大麦膜贯通蛋白。

3.2 不同发育阶段的差异表达基因 植物在不同发育阶段的基因表达会有改变,SSH技术不仅能得到大量的差异表达基因,还可以用于分离特定发育阶段特殊表达的新基因。

3.2.1 营养器官发育过程差异表达基因的分离 在与根发育相关基因中,Bouton等(2005)用苜蓿(*Medicago truncatula*)胚根萌发前和萌发后的胚轴构建了SSH文库,获得一个编码132个氨基酸并富含脯氨酸蛋白的基因(*MtPPRD*)。MtPPRD虽然在蛋白质水平上与植物脂转移蛋白(LTPs)的同源性低(21%~23%),但它具有所有植物LTP都有的保守的8个半胱氨酸残基,这是一个与运载疏水分子相适应的疏水孔结构,该基因在苜蓿胚轴发育期特异性表达。Bassani等(2004)在玉米根伸长期优先表达并与根部伸长相关的基因中分离到150个非冗余cDNA克隆,Northern杂交分析得到41个差异表达和几个候选基因。罗志勇等(2003)在一年和四年生人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)根组织中构建了SSH文库,对其中筛选到的40个阳性cDNA克隆进行酶切、PCR、反向Northern杂交鉴定、DNA测序以及核苷酸序列同源性比较,从中筛选出6个无对应同源基因的差减克隆,显示它们是代表新的基因序列的。他们又用Northern印迹杂交验证和半定量RT-PCR进一步验证确认,6个转录本为根发育阶段的差异性表达基因。从而提示它们在人参皂苷生物合成中发挥可能作用,这些结果为克隆上述新基因cDNA全长序列和深入鉴定其在人参皂苷生物合成中的功能提供了实验基础。

Faivre-Rampant等(2004)用SSH技术构建富集马铃薯(*Solanum tuberosum*)块茎顶芽解除休眠上调表达基因的cDNA文库,得到385个代表不同基因的cDNA序列,从中鉴定了一个编码激素应答基因家族成员的cDNA(*ARF6*),并研究其表达的结果表明,在休眠芽中该基因不表达。Hinderhofer和Zentgraf(2001)从拟南芥叶片衰老期间差异表达的基因中克隆到WRKY53基因,其在生长6周的叶片中表达量最高,一直持续到7周,到8周时该基因的表达开始减弱,表明WRKY53基因是在

叶片衰老早期表达的, 因而他们认为它可能在叶片衰老早期起调控作用。

3.2.2 繁殖器官差异表达基因的分离 刘军等(2000)从水稻幼穗分生组织 SSH 文库的 EST 序列中得到 2 个已知的水稻基因的克隆、11 个有较高同源序列和 18 个无同源序列的克隆, 据此他们认为, 繁殖器官有与营养器官不同的特异基因表达。为了获得大麦麦粒发育过程中分子水平的信息, Jang 等(2003)以受精 14 d 的大麦为检测子, 受精 5 d 的为驱动子构建了 SSH 文库, 分离到 1 个与水稻中一种特殊钙结合蛋白同源的克隆, 经 cDNA 文库筛选, 得到 2 个编码钙结合蛋白的克隆, 每一个都含有 EF-hand motif, 定名为大麦 Ca 结合蛋白 1 (*Hordeum vulgare calcium binding protein 1, HvCaBP1*), Northern 杂交显示, 其在受精 8 d 的麦粒中表达最强。Kim 等(1999a)分离到受香石竹 (*Dianthus caryophyllus*) 花成熟诱导 (flower maturation-induced, CFMI) 的差异表达的 cDNA 克隆, 其中的 CFMI-3 基因的全长序列与动物分泌的磷脂酶 A2 (PLA2) 相似, 即含有一个 PLA2 的活性位点——钙离子结合区和 12 个丝氨酸残基, 这是 PLA2 特有的结构。另外还确定了 5 个受香石竹花成熟诱导的 CFMI 基因, 其中 CFMI-5 与半胱氨酸蛋白酶抑制剂有很高的同源性, 显示它参与花的成熟调控 (Kim 等 1999b)。

3.2.3 转基因植物或突变体基因的克隆 为阐明水稻抗稻瘟病的机制, 寻找抗稻瘟病相关的基因, Han 等(2004)从分离鉴定的水稻抗稻瘟病突变体的诱导表达基因中, 分离到 26 个受稻瘟病感染高表达的 cDNA。其中包含 3 个不同的病程相关蛋白 5 (pathogenesis-related proteins 5, PR5) 和 4 个不同的蛋白酶抑制剂的两组抗性相关蛋白, 这些基因在突变体中均高表达。此外, 他们还分离到编码信号传递和调控蛋白的基因 (包括翻译起始因子 eIF5A 和 C2 区域 DNA 结合蛋白)。

Ranjan 等(2004)将 SSH 技术用于鉴定不同发育阶段组织和转基因的美洲山杨 (*Populus tremuloides* Michx.), 随着 4-香豆素辅酶 A 连接酶 (4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL1) 表达的

下调和生长加强的基因差异表达, 他们从顶芽、幼茎幼叶和根尖的 SSH 文库中总共得到 11 308 个表达序列标签, 代表了 5 028 不重复的转录表达序列标签, 编码 4 224 个独立的蛋白。大约 14% 的 EST 序列在现有的 *Populus* EST 数据库中没有记录。蔡应繁等(2003)采用 SSH 构建了棉属突变体 ‘湘棉 18’ 种子萌发过程中腺体发育形成前后的 2 个不同时期的 SSH 差减文库。通过差示筛选及反式 Northern 检测, 获得的色素腺体形成时期特异表达或优势表达的 cDNA 片段的结果表明, 这些 cDNA 所涉及的基因, 多数是棉属中新发现的, 它们与发育调控、细胞凋亡和蛋白质合成密切相关。

3.3 不同自然生态环境中植物基因表达的差异 廖斌等(2004)将 SSH 技术用于研究生长在 2 种生态环境 (古铜矿山和正常土壤) 中的鸭跖草 (*Commelina communis*) 基因表达差异。他们以生长在铜矿山鸭跖草作为检测子, 非铜矿山上生长的鸭跖草为驱动子, 建立了生长于铜矿山生态环境中鸭跖草的差异表达 cDNA 文库, 此 cDNA 文库代表铜矿山的鸭跖草中特异表达 cDNA。通过反式 Northern 杂交筛选出 3 个阳性克隆并进行测序, 序列分析表明其中 1 个 cDNA 为 CaM-like 基因。他们进一步对此基因进行反向 Northern 分析的结果初步表明, 此基因可在生长于古铜矿山上的鸭跖草中上调表达。

3.4 外界生物因素的诱导

3.4.1 病原菌的诱导 植物受到病原菌侵染时, 会产生一系列的反应, 采用 SSH 方法可以在短时间得到多个受病原菌侵染的植物差异表达基因, 这为克隆抗病相关的新基因建立了技术基础。骆蒙等(2002)以小麦抗白粉病品系 ‘百农 3217×Mardel’ 为材料, 构建了白粉病菌诱导的抑制消减杂交文库, 得到与已知抗病相关的 EST 序列 199 条。其中系统获得性免疫基因 (SAR) 最多, 其余为有关 SA 信号传递系统和丝裂素活化蛋白 (mitogen-activated protein, MAP) 相关的信号传递系统, 这一结果表明, 上述三类基因参与小麦抗白粉病过程。田振东等(2003)在研究分离到的与马铃薯晚疫病

(*Phytophthora infestans*) 相关的基因中, 以接种马铃薯晚疫病菌 48 h 的马铃薯为材料, 构建了基因差异表达的 SSH 文库, 从中随机抽取 150 个 cDNA 克隆杂交的结果表明, 26 个克隆在抗性反应中表达活跃, 其中有 7 个不同的表达片段与晚疫病诱导的马铃薯叶的 EST 序列具有很高的同源性, 这与来自番茄、烟草和拟南芥的 cDNA 部分片段相同, 4 个是无同源性的 cDNA 片段。这些基因可能是参与病害反应过程的新基因。Degenhardt 等 (2005) 用 SSH 法, 以苹果抗病 (*Malus domestica* cv. Remo) 和易感病 (*M. domestica* cv. Elstar) 的品种感染苹果黑心病菌 (*Venturia inaequalis*) 的叶片为材料, 构建基因差异表达文库时发现编码与植物防御有关的基因 β -1, 3 葡聚糖酶 (β -1, 3-glucanase)、类核糖核酸酶 (ribonuclease-like 10, PR10)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (cysteine protease inhibitor)、内切几丁质酶 (endochitinase)、亚铁螯合酶 (ferrochelatase) 和 ADP-核糖基化因子 (ADP-ribosylation factor) 等与病程相关蛋白的基因在品种 ‘Remo’ 中高表达, 而与活性氧解毒相关的基因如超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 在 ‘Elstar’ 中高表达。这表明病程相关蛋白基因的高表达可保护 ‘Remo’ 不受病原菌的侵害。Kong 等 (2005) 研究由镰刀霉菌 (*Fusarium graminearum*) 诱导的小麦基因差异表达时, 以接种分生孢子的小麦为材料, 得到正向和反向的 SSH 文库, 并分离到 24 个只在正向差减文库中存在的序列。

3.4.2 共生菌与植物间的相互作用 为了研究寄主植物对菌根真菌附着发育应答的基因表达变化并获得特殊表达的基因, Wulf 等 (2003) 用以枝菌根真菌 (*Glomus intraradice*) 接种 3 周的苜蓿根的 cDNA 为检测组, 与 2 个病原菌丝束霉菌 (*Aphanomyces euteiches*) 和苜蓿根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*)、未感染的磷酸盐培养的 4 种苜蓿根混合 RNA 转录的 cDNA 为驱动组进行差减杂交, 得到 1 805 个克隆, 它们的插入序列主要在 300~1 500 bp 之间。经分析, 在 20 个受丛枝菌诱导表达的 cDNA 序列中, 有 11 个的氨基酸序列与其它植物的蛋白有着很高的同源性, 主要是编码植物血凝素、磷

酸盐转运子、硝酸盐转运子、谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 等基因, 另外 9 个是无同源基因。Brechenmacher 等 (2004) 以接种摩西球囊霉菌 (*Glomus mosseae*) 后 20 d 的苜蓿根为材料, 采用 SSH 技术、表达谱研究和 EST 测序鉴定了苜蓿与摩西球囊霉菌间共生并相互作用的 12 个植物和 6 个真菌的基因, 结果是所有植物基因和 3 个真菌基因在共生组织中表达水平高。只有 3 个基因即类胚蛋白 (germin-like protein)、GST、PR10 有过报道, 其余 15 个基因在菌根中是首次报道, 2 个是新的序列。6 个苜蓿基因在根表面形成附着胞时表达活跃, 说明其在菌根初期形成过程中起作用。同时, 另有 6 个基因只在菌根后期诱导表达, 这些可能与共生结合体的形成和功能有关。磷酸盐对这些植物基因表达没有明显影响。摩西球囊霉菌基因表达谱分析的结果表明, 有 2 个与根上附着胞的发育有关, 1 个与菌根的形成和功能有关, 另外 3 个菌的基因在摩西球囊霉菌的生活期间均表达。

总之, 由于 SSH 综合了 DD-PCR 和 cDNA-RDA 2 种技术的特点, 具有高阳性率、高灵敏度和高效率等特点, 这项技术已在植物、动物和人类的基因克隆中得到了应用。相信随着 SSH 技术的日臻完善以及这项技术与其它技术的结合 (如与 Northern 杂交技术、cDNA 微阵法等) 的结合使用, SSH 技术必将在生物差异表达基因的分离中得到进一步发展和更广泛的应用。

参考文献

- 蔡应繁, 莫剑川, 曾宇, 任薇薇, 苗琛, 徐莺, 王胜华, 陈放 (2003). 抑制性消减杂交方法克隆棉属突变材料腺体发育相关的 cDNAs. 北京林业大学学报, 25 (3): 6~10
- 刁丰秋 (1998). 植物发育基因克隆技术的新进展. 生物工程进展, 18 (2): 12~15
- 廖斌, 邵冬梅, 杨兵, 束文圣, 栾天罡, 蓝崇钰 (2004). 鸭跖草 *Commelina communis* 中差异表达 cDNA 片段的克隆与分析. 中山大学学报 (自然科学版), 43 (1): 75~78
- 刘军, 袁自强, 刘建东, 钱晓茵, 钱文, 杨金水 (2000). 应用抑制差减杂交法分离水稻幼穗发育早期特异表达的基因. 科学通报, 45 (13): 1392~1397
- 陆秋恒, 罗志勇 (2001). 抑制消减杂交 (SSH) 技术及在克隆基因方面的最新进展. 国外医学分子生物学分册, 33 (6): 380~383

- 骆蒙, 孔秀英, 霍纳新(2002). 基于抑制消减杂交方法的小麦抗白粉病相关基因表达谱. 科学通报, 47 (16): 1237~1241
- 罗志勇, 陆秋恒, 刘水平, 陈湘晖, 罗建清, 汤立军, 胡维新(2003). 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, 35 (6): 554~560
- 田振东, 柳俊, 谢从画(2003). 利用抑制差减技术分离马铃薯晚疫病抗性相关基因. 遗传学报, 30 (7): 597~605
- 王利军, 战吉成, 黄卫东(2002). 水杨酸与植物抗逆性. 植物生理学通讯, 38 (6): 619~624
- 王转, 贾晋平, 景蕊莲(2003). 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, (5): 36~39
- 杨洪强, 贾文锁, 张大鹏(2001). 植物水分胁迫信号识别与转导. 植物生理学通讯, 37 (2): 149~154
- 曾日中, 段翠芳, 黎瑜, 郝秉中(2003). 茉莉酸刺激的橡胶树胶乳cDNA消减文库的构建及其序列分析. 热带作物学报, 24 (3): 1~6
- Bahn SC, Bae MS, Park YB, Oh SI, Jeung JU, Bae JM, Chung YS, Shin JS (2001). Molecular cloning and characterization of a novel low temperature-induced gene, *bIti2*, from barley (*Hordeum vulgare* L.). Biochim Biophys Acta, 1522 (2): 134~137
- Bassani M, Neumann PM, Gepstein S (2004). Differential expression profiles of growth-related genes in elongation zone of maize primary roots. Plant Mol Biol, 56 (3): 367~380
- Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, Burrows PR, Steinbiss HH, Antoniw JF (1995). An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. Nucleic Acids Res, 23 (21): 4520~4523
- Bouton S, Viau L, Lelievre E, Limami AM (2005). A gene encoding a protein with a proline rich domain (MtPPRD1), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. J Exp Bot, 56 (413): 825~832
- Brechenmacher L, Weidmann S, van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson V (2004). Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. Mycorrhiza, 14 (4): 253~262
- Chen X, Yuan H, Chen R, Zhu L, Du B, Weng Q, He G (2002). Isolation and characterization of triacontanol-regulated genes in rice (*Oryza sativa* L.): possible role of triacontanol as a plant growth stimulator. Plant Cell Physiol, 43 (8): 869~876
- Cho SK, Jeung JU, Kang KH, Shim KS, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Hwang HG, Choi HC et al (2004). Identification of genes induced in wound-treated wild rice (*Oryza minuta*). Mol Cells, 17 (2): 230~236
- Degenhardt J, Al-Masri AN, Kürkcüoğlu S, Szankowski I, Gau AE (2005). Characterization by suppression subtractive hybridization of transcripts that are differentially expressed in leaves of apple scab-resistant and susceptible cultivars of *Malus domestica*. Mol Genet Genomics, 273 (4): 326~335
- Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED et al (1996). Suppression subtractive hybridization: a method for generation differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc Natl Acad Sci USA, 93 (12): 6025~6030
- Duguid JR, Dinauer MC (1990). Library subtraction of *in vitro* cDNA libraries to identify differentially expressed genes in scrapie infection. Nucleic Acids Res, 18 (9): 2789~2792
- Faivre-Rampant O, Cardle L, Marshall D, Viola R, Taylor MA (2004). 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, 55 (397): 613~622
- Han CU, Lee CH, Jang KS, Choi GJ, Lim HK, Kim JC, Ahn SN, Choi JE, Cha JS, Kim HT et al (2004). Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. Mol Cells, 17 (3): 462~468
- Hinderhofer K, Zentgraf U (2001). Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. Planta, 213 (3): 469~473
- Hubank M, Schatz DG (1994). Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Res, 22 (25): 5640~5648
- Jang CS, Lee MS, Kim JY, Kim DS, Seo YW (2003). Molecular characterization of a cDNA encoding putative calcium binding protein, *HvCaBP1*, induced during kernel development in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Rep, 22 (1): 64~70
- Jiang XC, Guo XH, Pan XL, Song SQ (2004). Construction and differential screening of a cDNA library specific to osmotic stress of *Haloxylon ammodendron* seedlings. J Biochem Mol Biol, 37 (5): 527~532
- Kang HG, Foley RC, Oñate-Sánchez L, Lin C, Singh KB (2003). Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. Plant J, 35 (3): 362~372
- Kim JY, Chung YS, Ok SH, Lee SG, Chung WI, Kim IY, Shin JS (1999a). Characterization of the full-length sequences of phospholipase A₂ induced during flower development. Biochim Biophys Acta, 1489 (2~3): 389~392
- Kim JY, Chung YS, Paek KH, Park YI, Kim JK, Yu SN, Oh BJ, Shin JS (1999b). Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive

- hybridization. *Mol Cells*, 9 (4): 392~397
- Kong L, Anderson JM, Ohm HW (2005). Induction of wheat defense and stress-related genes in response to *Fusarium graminearum*. *Genome*, 48 (1): 29~40
- Liang P, Pardee AB (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257 (5072): 967~971
- Liao H, Wong FL, Phang TH, Cheung MY, Li WY, Shao G, Yan X, Lam HM (2003). *GmPAP3*, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. *Gene*, 318: 103~111
- Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259 (5097): 946~951
- Ranjan P, Kao YY, Jiang H, Joshi CP, Harding SA, Tsai CJ (2004). Suppression subtractive hybridization-mediated transcriptome analysis from multiple tissues of aspen (*Populus tremuloides*) altered in phenylpropanoid metabolism. *Planta*, 219 (4): 694~704
- Rishi AS, Munir S, Kapur V, Nelson ND, Goyal A (2004). Identification and analysis of safener-inducible expressed sequence tags in *Populus* using a cDNA microarray. *Planta*, 220 (2): 296~306
- Sahr T, Voigt G, Paretzke HG, Schramel P, Ernst D (2005). Calcium-affected gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, 165 (3): 747~754
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, 270 (5235): 467~470
- Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG, Danna KJ (1995). Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 23 (22): 4738~4739
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). Serial analysis of gene expression. *Science*, 270 (5235): 484~487
- Verica JA, Maximova SN, Strem MD, Carlson JE, Bailey BA, Gultinan MJ (2004). Isolation of ESTs from cacao (*Theobroma cacao* L.) leaves treated with inducers of the defense response. *Plant Cell Rep*, 23 (6): 404~413
- von Stein OD, Thies WG, Hofmann M (1997). A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 25 (13): 2598~2602
- Wan JS, Sharp SJ, Poirier GM, Wagaman PC, Chambers J, Pyati J, Hom YL, Galindo JE, Huvar A, Peterson PA et al (1996). Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol*, 14 (13): 1685~1691
- Wang X, Wu P, Xia M, Wu Z, Chen Q, Liu F (2002). Identification of genes enriched in rice roots of the local nitrate treatment and their expression patterns in split-root treatment. *Gene*, 297: 93~102
- Watt DA (2003). Aluminium-responsive genes in sugarcane: identification and analysis of expression under oxidative stress. *J Exp Bot*, 54 (385): 1163~1174
- Welsh J, Chada K, Dalal SS, Cheng R, Ralph D, McClelland M (1992). Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res*, 20 (19): 4965~4970
- Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Kuster H, Krajinski F (2003). Transcriptional changes in response to Arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact*, 16 (4): 306~314
- Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y et al (2004). Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. *Plant Mol Biol*, 55 (6): 807~823