

分离差异表达基因的方法

黄 薇¹ 方孝东² 赵文明¹ 林栖凤^{2*}

¹(西安交通大学生命科学与技术学院,西安 710049)

²(海南大学生物科学技术研究所,海口 570228)

摘 要 了解不同细胞或同类细胞在不同发育阶段、不同生理状态下的基因表达状况,可以为研究生命活动过程提供重要信息。以差别筛选,扣除杂交等基本方法为出发点,研究基因表达差异的方法不断完善,先后出现了 DDRT-PCR, RDA, SSH, cDNA 微阵列(基因芯片)等技术。这里着重对这些方法的优缺点及改进进行了论述和评介,并对技术的发展趋势进行了分析。

关键词 差异表达基因,代表性差异分析,抑制性扣除杂交,cDNA 微阵列

中图分类号 Q-3 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)04-0521-04

了解不同细胞或同类细胞在不同发育阶段、不同生理状态下的基因表达状况,可以为研究生命活动过程提供重要信息。从研究肿瘤发生开始,人们已经把基因表达差异的研究拓展到了诸如病理、植物胚胎发育、形态发生、信号传导、植物抗逆、抗病等众多领域。而分离与克隆相关基因是了解这些生命过程的基础。早期使用的差别筛选技术和扣除杂交法灵敏度低,工作量大,成本高,重复性差,已逐渐被淘汰。以二者为出发点,分离差异表达基因的技术不断发展与完善,先后又建立了 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)^[1],代表性差异分析(RDA)^[2,3],抑制性扣除杂交(SSH)^[4]等方法,同时,为满足进行大规模基因信息解析的需求,cDNA 微阵列和基因芯片技术也已经应运而生。目前,这些方法已得到广泛应用,并且成功地分离了病理^[5]、免疫^[6]、植物抗逆^[7]、组织特异性表达^[8]等相关基因。这些方法各有优缺点,对一项具体研究而言,选择合适的方法是十分重要的。鉴于此,本文对目前几种常用方法进行了论述和评介,同时对技术的发展趋势进行了分析,希望对技术的选择能有所帮助。

1 mRNA 差异显示技术(DDRT-PCR)

1992年由P. Liang等建立的mRNA差异显示技术利用真核细胞mRNA 3'-poly(A)⁺尾,选取T₁₂ MN(M=A/C/G,N=A/G/C/T)作为锚定引物与mRNA的poly(A)⁺尾结合,在反转录酶作用下启动mRNA群体的反转录,用另一随机寡核苷酸引物进行PCR扩增。由于寡核苷酸随机引物随机结合在cDNA的互补靶位点上,因此来自不同mRNA扩增片段的大小是不同的,通过电泳即可显示差异表达的cDNA片段。

DDRT-PCR以PCR技术为基础,能将mRNA表达差异进行放大,因此可以对低丰度mRNA进行鉴定,具有操作简便,灵敏度高的优点,但它也存在假阳性率高、重复性差、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'端的非编码序列以及序列胶分析结果常呈弥散(Smear)状态等不足之处^[9]。

自1992年建立以来,差异显示法又经过了不少改进,如引物、电泳条件、探针的标记等,使之得以不断完善。然而,有些缺点,如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'端的非编码序列以及PCR优先扩增高丰度序列等,是由该方法本身的原理所决定的,仅仅依靠技术本身的改进是无法克服的。

2 代表性差异分析(Representational difference analysis of cDNA, cDNA RDA)

cDNA RDA技术^[3]是在Lisitsyn等^[2]建立的基因组RDA技术之上发展而来的。在cDNA RDA技术中,Tester和Driver cDNA首先用识别4个碱基的内切酶消化,然后分别接上寡聚核苷酸接头(Adaptor),并以接头为引物进行PCR扩增,随后切除它们的接头,仅在Tester 5'末端接上新接头,然后与大大过量的Driver混合杂交,杂交产物经Taq酶补平3'末端后以新接头为引物进行PCR扩增。杂交形成3种杂交体,即Tester/Tester, Tester/Driver, Drive/Driver。3种杂交体中只有Tester/Tester杂交体两个5'端都带有新接头(见图1),补平3'末端后,两条链均能与PCR扩增引物配对,因此其扩增为指数扩增。其它杂交体呈线性扩增或无法进行扩增。经过首

轮 RDA 过程, Tester 中的目的 DNA 将得到第一次富集。将第一轮产物更换新接头, 进行第二轮 RDA 过程, 目的 DNA 可得到进一步的富集。

错配问题, 假阳性很低。然而, 该技术也存在许多缺陷, 如需要高质量的 Driver DNA 和 Tester DNA; 不能解决个体 mRNA 在丰度上存在巨大差异的问题, 当靶序列浓度较低时, 其富集受抑制等。此外, 它还存在操作繁琐, 实验周期较长、实验成本相对较高等不足之处。

为此, 我们对 RDA 实验方法进行了改进 (见图 2): 首先, 在杂交缓冲液中加入 10% PEG 8000 以促进杂交, 这样可将每轮杂交所用 Driver DNA 的用量由 40 μ g 减至 4 μ g, Tester 的用量随之降低; 第二, Driver DNA 和 Tester DNA 经限制性内切酶消化之后, 分别与不同的接头连接, 并进行 PCR 扩增制备代表性扩增子; 第三, 制备好的 Tester 和 Driver 代表性扩增子无需换接头即可直接用于杂交, 杂交产物经绿豆芽核酸酶 (MBN) 消化后进行 PCR 扩增即得到该轮差异产物, 差异产物可直接与 Driver DNA 进行下一轮杂交。改进后的 RDA 减少了 Driver DNA 用量, 节省了 Taq 聚合酶的消耗, 整个实验过程中只在制备代表性 DNA 时进行酶切及连接的操作, 简化了实验步骤, 只需不到 1 周的时间即可轻松完成原本 3 周才能完成的实验, 同时减少了昂贵的内切酶、连接酶和接头的消耗, 降低了实验成本, 使得改进后的 RDA 更具有了简便、快捷、经济、实用的优点, 增强了该方法的应用性(待发表)。

3 抑制性扣除杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH)

RDA 不能解决高丰度序列对低丰度序列富集的干扰, 因此通常需要进行多轮的扣除杂交过程。针对此缺陷, Diachenko 等在 RDA 的基础上发展出了 SSH 技术^[4]。SSH 在保留 RDA 的差减富集和动力学富集因素的同时, 通过在杂交之前对 cDNA 的丰度进行均一化处理, 使丰度上有差别的单链 cDNA 相对含量基本一致, 从而解决了高丰度序列对低丰度序列富集的干扰。

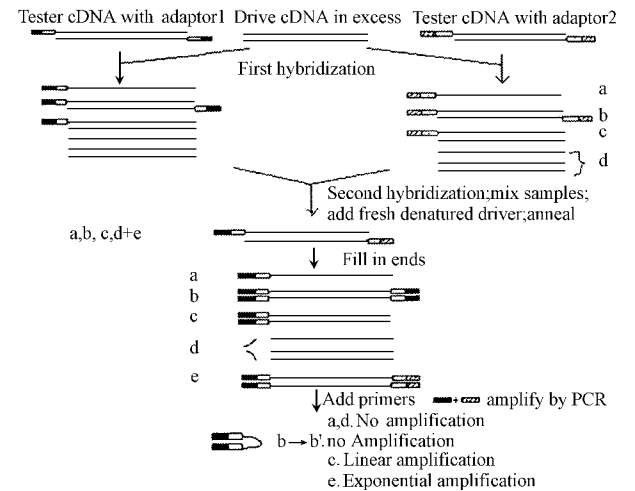


图 3 SSH 过程示意图

Fig.3 The scheme of the SSH

在 SSH 过程中, Tester cDNA 被分为两部分, 分别接上不同的接头 (Adaptor1 和 Adaptor2) 然后将过量的 Driver 分别加入两份 Tester 样品中进行杂交。样品热变性退火, 单链

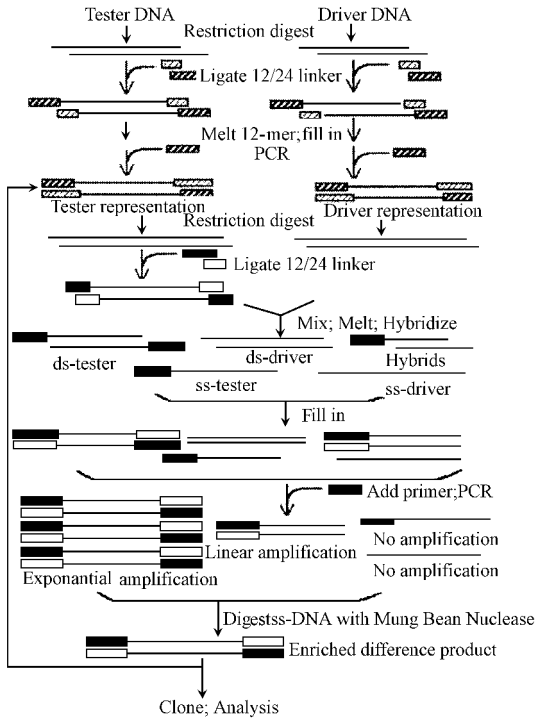


图 1 RDA 过程示意图

Fig.1 The scheme of the RDA

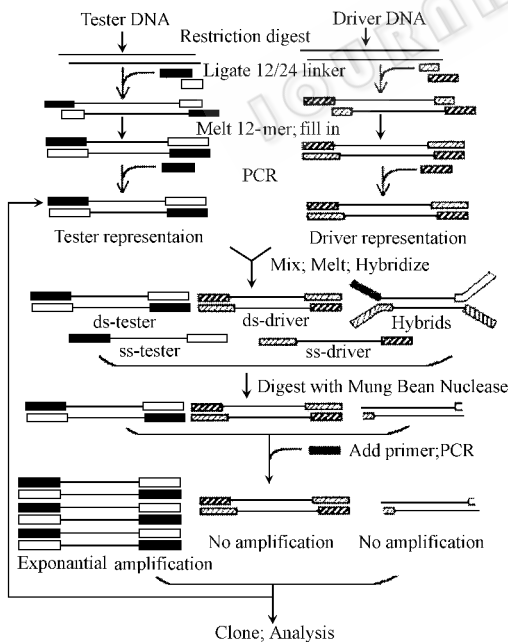


图 2 RDA 改进示意图

Fig.2 The improvement of the RDA schedule

cDNA RDA 技术实现了对靶序列的差减杂交富集和动力学富集, 可以使靶序列在三轮杂交后被富集百万倍以上, 仅占 Tester 中 0.0005% 的靶序列也可以得到分离与富集。同时, 长引物 (24mer) 及高退火温度 (70 或 72 $^{\circ}$ C) 避免了引物

cDNA 均一化。Tester 中与 Driver 共有的非靶 cDNA 与 Driver 杂交,而靶 cDNA 由于差异表达而得到第一次富集。混合第一次杂交的两份样品,再一次加入变性 Driver,只有在第一轮杂交过程中未退火的 Tester cDNA 才能再结合形成 b、c 和新的 e 杂交体(见图 3)^[4]。新形成的杂交体 e 与第一次和第二次形成的杂交体 b、c 有明显不同的特征,即 e 杂交体的 5' 端有不同的接头序列,一个来自于样品 1 (Adaptor1),另一个来自于样品 2 (Adaptor2)。随后进行的 PCR 扩增所采用的引物 P1 和 P2 的序列分别与 Adaptor1 和 Adaptor2 的外段序列相同,这样只有 e 型分子两端的接头均能和引物配对,进行指数扩增,而其余分子或者无法进行扩增,或者只能进行线性扩增。

对富集高丰度和低丰度差异表达基因的 cDNA 而言,SSH 技术是一种简单而有效的方法,一轮 SSH 过程仅需 3~4 d 的时间,均一化步骤使 SSH 可以一次分离到上百个差异表达的基因,阳性率有时可高达 94%^[10],但如此多的差异产物也增加了后期的分析工作。同时,与 RDA 相比,SSH 只进行一轮杂交循环,差异基因的富集程度较低,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。

4 cDNA 微阵列和基因芯片

上述技术都是基于扣除杂交或差异筛选技术之上的,他们均面临一个共同的、难以解决的矛盾,即要达到有效地扣除,必然会丢失一些表达差异较小的或是低拷贝的基因,而获得较为全面的差异产物的同时,又增加了后期的分析工作。cDNA 微阵列和基因芯片是用 reverse Northern 斑点杂交来检测基因表达差异的技术,它把代表不同待检测基因的 cDNA 或特异的寡聚核苷酸固定在固相支持物上,并与来自不同细胞、组织或同一细胞不同状态下的 DNA 探针或 cDNA 探针进行杂交,然后用特殊的检测系统对每个杂交点进行定量分析,杂交信号的有无或强弱反映了其所代表的基因在不同细胞、组织或器官中的表达状况。这样就可以以定量的方式同时对大量基因的表达差异进行对比分析。

cDNA 微阵列和基因芯片技术的优越性是十分明显的,它解决了上述几种方法所面临的富集与扣除之间的矛盾,目前已经在人类疾病诊断^[11]、文库筛选^[12]、转录调控^[13]、植物抗逆性研究^[7]等领域得到了越来越广泛的应用并获得了巨大成功,将来必将成为该领域的技术主流。然而,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,此外,成本过高,灵敏度低以及点在玻璃片上的 array 不能重复使用等问题也是目前限制该方法广泛应用的主要因素。

5 前景与展望

综上所述,cDNA 微阵列和基因芯片技术具有十分突出的优点,然而目前还无法广泛采用。其它几种方法都有各自独特的优点和局限性,将不同方法有机地结合起来不失为一种良策。现在已有实验室将 cDNA 微阵列技术与 RDA 或

SSH 相结合,作为 RDA 及 SSH 产物的鉴定技术,对阳性差减产物进行快速、有效的筛选^[14,15]。这种结合可能是目前分离与鉴定差异表达基因的一个较好的选择。

分离差异表达基因的方法很多,除了以上介绍的几种技术之外,还有 RFLP 与区域定向差异技术相偶联的 DDRT-PCR (RFLP-coupled domain directed differential display, RC4D) 技术,交互扣除 RNA 差别显示技术,以及基因表达系列分析 (Serial analysis of gene expression, SAGE) 等,限于篇幅,在此不作介绍。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Liang P, Pardee D B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (14): 967~971
- [2] Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 1993, **259**: 946~951
- [3] Hubank M and Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5640~5648
- [4] Diachenko L, Lau Y C, 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 USA*, 1996, **93**: 6025~6030
- [5] Sturtevant V. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and medical mycology. *Clinical Microbiology reviews*, 2001, **13** (3): 408~427
- [6] Dunphy J L, Balic A, Garry J *et al.* Isolation and characterization of a novel inducible mammalian galectin. *J Biol Chem*, 2000, **275** (41): 32106~32113
- [7] Motoaki Sekia, Mari Narusala, Hiroshi Abec *et al.* Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stress by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 2001, **13**, 61~72
- [8] Hiromu Ito, Haruhiko Akiyama, Hiroshi Iguchi *et al.* Molecular cloning and biological activity of a novel lysyl oxidase-related gene expressed in cartilage. *Biol Chem*, 2001, **276** (26): 24023~24029
- [9] LI Y J (李玉京), LI Z Y (李子银), LI Z S (李振声). Study progress of differential display reverse transcription PCR in Eukaryotes. *Biotechnology Information (生物技术通报)*, 1998, **5**: 23~30
- [10] Von Stein O D, Thies W G, Hormann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (13): 2598~2602
- [11] Marcia R Saban, Helen Hellmich, Ngoc-Bich Nguyen *et al.* Time course of LPS-induced gene expression in a mouse model of genitourinary inflammation. *Physiol Genomics*, 2001, **5**: 147~160
- [12] Ramamurthy M, Nina F. Screening insertion libraries for mutations in many genes simultaneously using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, **98** (13): 7420~7425
- [13] Radhika Desikan, Soheila A H Mackerness, John T Hancock *et al.* Regulation of gene expression in Arabidopsis thaliana by oxidative stress. *Plant*

Physiol. 2001, **127**: 159 ~ 172

- [14] George P Yang, Douglas T Ross¹, Wayne W Kuang *et al.* Weigel
Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of dif-
ferentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27**(6): 1517

~ 1523

- [15] Müller K, Heller H, Doerfler W. Foreign DNA integration. *J Bio-
logical Chemistry*, 2001, **276**(17): 14271 ~ 14278

The Methods of Identifying Differences in mRNA Expression

HUANG Wei¹ FANG Xiao-Dong² ZHAO Wen-Ming¹ LIN Qi-Feng^{2*}

¹(*Life Science and Technology Institute of Xi 'an Jiaotong University, Xi 'an 710049, China*)

²(*Biology Science and Technology Institute of Hainan University, Haikou 570228, China*)

Abstract Identifying changes in gene expression is of prime interest in molecular biology. A variety of methods have been developed for analyzing differentially expressed genes. Among these techniques, differential display reverse transcription PCR (DDRT-PCR), representational difference analysis (RDA) and suppression subtractive hybridization (SSH), which were based on differentially screening and subtractive hybridization technology, are applied most widely. Gene chips (gene microarrays) for analyzing gene expression patterns on larger-scale had also been developed. Here we present a review of these methods.

Key words differentially expressed gene, RDA, SSH, cDNA arrays

Received : 01-07-2002

This work was supported by Grant from the Ninth Five Years Plan of National Science and Technique Foundation (No. 85-722-27-01).

* Corresponding author. Tel 86-898-66258112 ; Fax 86-898-66258650 ; E-mail : hnqifeng@yahoo.com.cn