

抑制消减杂交技术在植物病害研究中的应用

王 芳

(黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:抑制消减杂交技术以抑制性 PCR 技术和杂交二级动力学原理为基础,该技术具有高灵敏性、高效率、易操作等特点,是有效分离、克隆基因差异表达的方法之一。该文对其技术的原理、特点及其在植物寄生性线虫和植物抗病机制研究中的应用进行了综述。

关键词:抑制消减杂交技术;PCR;基因;植物

中图分类号:S432

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2011)11-0136-03

植物个体的生长发育、衰老和死亡,组织和细胞的分化、凋亡、变异及对环境因子的应激等都是由基因来调控的,这些都与基因的选择性差异表达有关。分离并克隆选择性目的基因是鉴定及分析基因的结构、表达及功能的前提。抑制性差减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)技术自发明以来,在医学、动物学和微生物研究中得到了广泛的应用。由于植物的基因组复杂性,分离得到高质量的 Total RNA 和 mRNA 具有一定的难度,因此在植物学研究中的应用还处于起步阶段。目前,该技术主要应用在植物生长发育过程中组织器官的分化及特异性表达、病原物的诱导表达、环境胁迫(水分胁迫、温度胁迫、盐胁迫)、同一个体不同组织内的基因表达差异、分析亲缘关系较近属之间的差异等方面。

1 SSH 技术的基本原理及特点

抑制消减杂交技术于 1996 年由 Diatchenko 等^[1]提出,该技术首先利用杂交二级动力学原理,即丰度高的单链 cDNA 片段在退火时产生同源杂交的速度快于低丰度的单链 cDNA 片段,从而使原来在丰度上有差异的 cDNA 片段的相对含量基本趋于一致。之后利用链内退火优先于链间退火的特点,使两端接有同一接头的非目的序列片段在退火时产生类似于“锅柄”的结构,在后续的 PCR 中无法与引物配对,从而选择性地扩增目的基因。SSH 技术的优点:(1)操作简单:不需分

离单链或双链 cDNA,接头设计简化,操作流程简单;(2)灵敏性高:可以使低丰度的 mRNA 得以高于 1 000 倍的富集,克服了低丰度的 mRNA 不易检测的问题;(3)效率高,周期短:一次 SSH 反应在几天内便可同时分离几十甚至上百个差异表达的 cDNA 片段;(4)假阳性率低:该技术利用 2 步杂交及 2 次 PCR,使补平接头后非特异的 cDNA 片段形成发夹结构不能被扩增,保证了特异 cDNA 片段的有效分离和扩增,再结合反式 Northern 技术,使阳性率达到 94%。

SSH 技术的缺点:(1)试验材料为新鲜的样品;(2)需要较高质量和一定浓度的 mRNA(一般为几微克),如果 mRNA 量不足,很可能检测不到低丰度差异表达基因的 cDNA,对于某些特殊材料不易获得一定数量的 mRNA;(3)因差减库中的 cDNA 是经过限制酶消化的 cDNA 片段,因此要想获得全长目的基因就要利用这些基因片段作为探针筛选 cDNA 文库或采用 RACE(Rapid Amplification of cDNA End)方法克隆基因全长;(4)完全无 Rsa I 酶切位点的片段或酶切位点较少的基因组,序列差异小的片段,如几个核苷酸位点的突变或重复,都不能使用该技术^[2]。

2 SSH 技术的基本步骤

SSH 技术操作分 5 个步骤见图 1。(1)分离两组相关样品的 mRNA(分别作为 Tester 和 Driver),反转录为 cDNA;(2)用限制性内切酶分别消化 Tester 和 Driver,使其形成长度小于 500 bp 的 cDNA 片段;(3)将 Tester cDNA 分成 2 份,分别连上接头 Adaptor1 和 Adaptor2;(4)用过量的 Driver cDNA 与(3)中 2 份连有接头的 Tester cDNA 进行 2 次消减杂交;(5)基于抑制反应和巢式 PCR 进行 2 次 PCR 反应,使差异表达

收稿日期:2011-07-01

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-004)

作者简介:王芳(1981-),女,山东省即墨市人,博士,助理研究员,从事分子植物线虫学研究。E-mail:wangfangnd@hotmail.com。

目的基因片段大量富集,增强其特异性扩增。

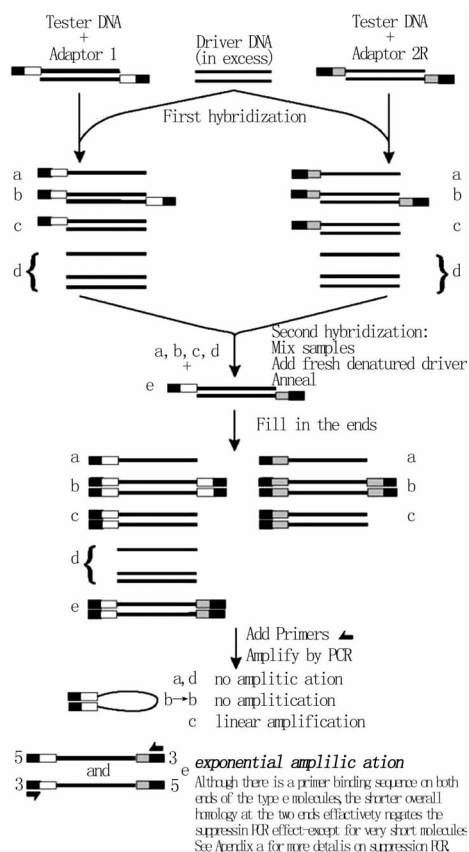


图1 抑制性差减杂交(SSH)步骤示意图

3 SSH技术在植物寄生性线虫研究中的应用

植物寄生线虫是一类重要的病原微生物,其食道腺分泌物在线虫侵染与寄主植物互作过程中起到重要作用,在研究二者互作过程的分子机制中,食道腺细胞表达的基因被分离鉴定。Gao B等^[3]采用 SSH 技术分离大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)在寄生阶段食道腺细胞及肠内区优先表达的基因,并结合 Southern blots 和原位杂交技术,结果原位显示预测的 8 个细胞外克隆有 4 个在线虫的背食道腺细胞特异表达,一个在亚腹食道腺细胞中特异性表达,3 个在肠道中特异性表达,预测的细胞核克隆和位于细胞质膜的克隆分别在亚腹食道腺细胞核和背食道腺细胞中表达。Huang G 等^[4]利用该技术构建了南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)食道腺细胞的差减 cDNA 文库,从中分离和鉴定了 2 个分支酸变位酶(CM)基因,分别命名为 *Mi-cm-1* 和 *Mi-cm-2*。推测这两个基因可能在线虫的入侵、入侵位点的选择或大豆防御抑制过程中发挥作用。通过原

位杂交显示 *Mi-cm-1* 和 *Mi-cm-2* 的转录在南方根结线虫的 2 个亚腹食道腺细胞中特异性聚集。Grenier 等^[5]利用此方法比较了马铃薯白线虫的 2 个群体 *G. Pallida* 和 *G. 'mexicana'* 转录后的基因表达差异,发现它们之间差异很小,并且得到了一个纤维素酶和一个致病因子,命名为 GPLIC5,此片段与 A18 致病因子一致。茆振川等^[6]结合抑制消减杂交和高密度点阵膜杂交技术构建由南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)诱导 *N* 基因介导表达的 EST 基因表达谱,获得已知上调抗性相关 EST 68 个。分离出编码 NBS-LRR 结构的抗线虫蛋白和类 LRR 抗性蛋白的基因,与抗性相关的类萌芽素(GLP)、HSR203J 蛋白、蜜腺蛋白、蛇毒素肽及 WRKY、ERFDP 等转录因子的基因。结果表明,*N* 基因介导的早期表达抗病基因涉及病原物的识别、抗性信号传导、过敏性坏死、系统获得性抗性以及植物细胞保护机制等多个方面。Sivananda V^[7]利用近等位基因系中的抗、感 2 个花生品种(*Arachis hypogaea*),构建了花生根结线虫(*Meloidogyne arenaria*)接种后早期的基因表达差异。初步筛选的 960 个 ESTs 在两个文库中有至少 3 倍的差异表达,70 个 ESTs 涉及了 7 大功能区,胁迫反应、代谢、转录调节、蛋白质合成和修饰、运输、细胞骨架及其它未知功能蛋白。

4 SSH技术在植物抗病基因研究中的应用

自 1999 年 SSH 技术得到首次使用以来,在分离和克隆样本间差异表达基因得到广泛应用,并且也成为研究植物抗病机制的有效方法之一。田振东^[8]通过构建马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*)诱导表达的 SSH 文库的基础上,克隆了一个晚疫病诱导基因 *POTHR-1*。骆蒙^[9]等通过比较白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)诱导小麦的普通 cDNA 和 SSH-cDNA 文库,结果表明参与光合作用、能量代谢及核糖体构成等的基因在普通文库中出现频率较高,而与抗病相关的蛋白质修饰及加工、信号传导、次生代谢、细胞壁结构修饰和抗病防御相关等基因的比例在 SSH-cDNA 文库中明显增加。于秀梅等^[10]通过构建和分析条锈菌(*Puccinia striiformis*)诱导小麦叶片的 SSH-cDNA 文库,推测 HR(Hypersensitivity Reaction)和 SAR(Systemic Acquired Re-

sistance)可能是小麦抗条锈病过程中的 2 种抗性形式。黄雪玲等^[11]通过分析条锈菌(*Puccinia striiformis*)诱导小麦成株期的 SSH-cDNA 文库,发现一个反转座子、酪蛋白激酶、糖原合成激酶和一类 FLHA 基因。Shim 等^[12]构建了野生稻经稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)诱导表达的差减文库,成功获得 180 个相关基因。张淑珍等^[13]构建了疫霉菌(*Phytophthora sojae*)诱导的大豆差异表达的 cDNA 消减文库,筛选到 2 067 个阳性克隆。朱妍^[14]构建黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)诱导甘蓝早期表达的混合 SSH 文库,获得 87 条高质量 EST,包含 3 条 EST 为 MAP3K α -蛋白激酶。唐永洽^[15]构建了霜霉病菌(*Peronospora parasitica*)诱导大白菜表达的正向 SSH 文库,获得 57 个病原菌诱导上调表达的克隆。曾永三^[16]构建了枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *beni*acasa)诱导的节瓜 SSH-cDNA 文库。张纯颖^[17]对黄萎病(*Verticillium wilt*)诱导陆地棉差异表达的 cDNA 文库进行分析,将获得非重复克隆的 EST 序列 203 条按比对推测的功能进行分类,主要包括代谢、防御、胁迫、信号转导、核糖体蛋白、细胞结构、细胞发育、能量、渗透调节以及蛋白质合成与分解等 10 类。

5 结论

植物体受到病原体侵染后会发生一系列的响应,其抗性机理是非常复杂的,植物对病原体侵入的防御反应涉及到多种功能基因的协同作用。要弄清植物在抗病过程中的分子调节机制,首要就是对选择性表达的基因进行分离、克隆和序列分析,然后对表达产物进行结构和功能分析。利用 SSH 技术分离和克隆差异表达基因的试验结果表明,SSH 技术在构建抗病基因表达谱研究中展现了良好的应用前景,已成为寻找分离、克隆表达基因和研究已知基因的新生物学功能的重要手段。

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[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(12): 6025-6030.
- [2] Lievens S, Goormachtig S, Holsters M. A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: looking back and looking forward[J]. Nucleic Acid Res, 2001, 29(17): 3459-3468.
- [3] Gao B, Allen R, Maier T, et al. Identification of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*[J]. Molecular Plant Pathology, 2001, 14(10): 1247-1254.
- [4] Huang G Z, Dong R H, Allen R, et al. Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(1): 1-3.
- [5] Grenier E, Blok V C, Jones J T, et al. Identification of gene expression differences between *Globodera pallida* and *G. mexicana* by suppression subtractive hybridization[J]. Mol Plant Pathol, 2002, 3: 217-26.
- [6] 菲振川, 谢丙炎, 杨宇红, 等. 辣椒 N 基因介导抗根结线虫作用早期表达基因的抑制性消减杂交 SSH 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(3): 629-636.
- [7] Sivananda V, Tirumalaraju, Mukesh Jain, et al. Differential gene expression in roots of nematode-resistant and-susceptible peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars in response to early stages of peanut root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria*) parasitization[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 10: 1016.
- [8] 田振东, 柳俊, 谢从华. 利用抑制差减杂交技术分离马铃薯晚疫病抗性相关基因[J]. 遗传学报, 2003, 30(7): 597-605.
- [9] 骆蒙, 孔秀英, 霍纳新. 基于抑制消减杂交方法的小麦抗白粉病相关基因表达谱[J]. 科学通报, 2002, 47(16): 1237-1241.
- [10] 于秀梅, 喻修道, 屈志鹏, 等. 条锈菌诱导的小麦抑制差减杂交文库构建及其表达序列标签研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 50-55.
- [11] 黄雪玲, 喻修道, 屈志鹏, 等. 小麦成株抗条锈性抑制差减杂交文库构建及表达序列标签分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(6): 976-981.
- [12] Shim K S, Cho S K, Jeung J U, et al. Identification of fungal (*Magnaporthe grisea*) stress induced genes in wild-rice (*Oryza minuta*) [J]. Plant Cell Report, 2004, 22(8): 599-607.
- [13] 张淑珍, 徐鹏飞, 吴俊江, 等. 大豆疫霉根腐病菌诱导下 SSH 文库构建及初步分析[J]. 大豆科学, 2008, 27(8): 543-545.
- [14] 朱妍, 王超. 利用 SSH 技术分离甘蓝抗黑腐病相关基因的研究[J]. 中国蔬菜, 2010(10): 20-24.
- [15] 唐永洽, 于拴仓, 朱月林, 等. 大白菜霜霉病诱导抑制性消减杂交 cDNA 文库的构建和分析[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(5): 453-458.
- [16] 曾永三, 孙辉, 黎志轩, 等. 枯萎病菌诱导的节瓜抑制差减 cDNA 文库的构建[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(3): 513-516.
- [17] 张纯颖, 王省芬, 张桂寅, 等. 黄萎病菌诱导下陆地棉抗病品种 SSH 文库的 EST 分析[J]. 棉花学报, 2010, 22(1): 17-22.

(下转第 142 页)

- without polyploidization; Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice[J]. *Genome Research*, 2006, 16:1262-1269.
- [9] Thomas W, Beat K. Genome-wide comparative analysis of copia retrotransposons in Triticeae, rice, and *Arabidopsis* reveals conserved ancient evolutionary lineages and distinct dynamics of individual copia families[J]. *Genome Research*, 2007, 17:1072-1081.
- [10] Marillonnet S, Wessler S R. Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing[J]. *Plant Cell*, 1997, 9:967-978.
- [11] Leprince A S, Grandbastien M A, Meyer C. Retrotransposons of the Tnt1B family are mobile in *Nicotiana glauca* and can induce alternative splicing of the host gene upon insertion[J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 47:533-541.
- [12] Du C, Swigoñova Z, Messing J. Retrotranspositions in orthologous regions of closely related grass species[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2006, 6:62.
- [13] Hirochika H. Activation of tobacco retrotransposons during tissue-culture[J]. *EMBO J.*, 1993, 12:2521-2528.
- [14] Sato Y, Sentoku N, Miur Y. Loss-of-function mutations in the rice homeobox gene OSH15 affect the architecture of internodes resulting in dwarf plants[J]. *EMBO J.*, 1999, 18:992-1002.
- [15] Kimur Y, Tosa Y, Shimada S, et al. OARE-1, a Tyl-copia retrotransposon in oat activated by abiotic and biotic stress[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2001, 42:1345-1354.
- [16] Okamoto H. Efficient insertion mutagenesis of *Arabidopsis* by tissue culture-induced activation of the tobacco retrotransposon Tto1[J]. *Plant Journal*, 2000, 23:291-304.
- [17] Sakamoto K, Ohmido N, Fukui K, et al. Site-specific accumulation of a line-like retrotransposon in a sex chromosome of the dioecious plant *Cannabis sativa*[J]. *Plant molecular Biology*, 2000, 44:723-732.
- [18] Mhiri C, de Wit P J G M, Grandbastien M A. Activation of the promoter of the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1999, 12:592-603.

Application of LTR-retrotransposons in Plant Genomes

GUO Yu-shuang¹, CHEN Jing¹, ZHANG Jian-hua², LI Xiang-yu³, HU Zhong-yi¹, REN Xue-liang¹

(1. Guizhou Tobacco Research Institute, Guiyang, Guizhou 550081; 2. Environment and Resources Science College of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058; 3. Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: Long terminal repeat(LTR)-retrotransposons are genetic elements and important for the plant genomic organization. This review described the structure, genomic organization, expression, regulation, and discusses their contributions to plant genomic research.

Key words: plant genome; LTR-retrotransposons; regulation; genomic research

(上接第 138 页)

Application of the Suppression Subtractive Hybridization Technique in Plant-Diseases

WANG Fang

(Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Based on the suppression PCR and subtractive hybridization, suppression subtractive hybridization (SSH) is a powerful technique that enables researchers to compare two populations of mRNA and obtain clones of genes that are expressed in one population but not in the other. SSH has become an efficient method that segregates and clone genes with the characteristics of high sensitivity, reliability and simplicity. The article introduced the principle and characteristics of SSH. The application on the study of plant-parasitic nematode and plant resistant-disease mechanism were reviewed.

Key words: suppression subtractive hybridization(SSH); PCR; genes; plant