

- 172
- 9 Okada S, Jeffrey E. Insulin and epidermal growth factor stimulate a conformational change in Rap1 and dissociation of the Crk II-C3G complex. *J Biol Chem*, 1997, **272** (45): 28179~ 28182
 - 10 Tachibana K, Urano T, Fujita H, *et al.* Tyrosine phosphorylation of Crk-associated substrates by focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (46): 29083~ 29090
 - 11 Natoli G, Costanzo A, Moretti F, *et al.* Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. *J Biol Chem*, 1997, **272** (42): 26079 ~ 26082
 - 12 Swanson D J, Zellmer E, Elaine J L. The homeodomain protein Arx interacts synergistically with cyclic AMP to regulate expression of neurotransmitter biosynthetic genes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (43): 27382~ 27392
 - 13 Shi Ying. Progress in the studies of intracellular signal transduction and transcription regulation. *Foreign Medical Science: Molecular Biology*, 1997, **19** (5): 203

Progress in the Studies of Intracellular Signal Transduction. PANG Sa, GONG Xing-Guo

(*Department of Biological Science and Technology, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China*).

Abstract The latest development on intracellular signal transduction mainly focus on Ca^{2+} pathways with their related protein molecules such as PKC, CaM, CaMK II, and Ras with their related protein molecules (such as Vav, Rap, Crk, C3G), cAMP, NF- κ B pathways as well. Through the above mentioned four pathways and the cross-talk among them, extracellular signal molecules activate some protein kinases which regulate gene transcription and other related functions. It should be noted that phosphorylation plays a significant role in regulating the activity of protein kinases and transcript factors.

Key words signal transduction, Ca^{2+} pathway, Ras pathway, cAMP pathway, NF- κ B pathway

差异显示反转录 PCR 技术研究进展

赵锦荣 阎小君 苏成芝

(第四军医大学基因诊断技术应用研究所, 西安 710033)

摘要 分析一对细胞或组织在不同状态下基因表达的差异, 已成为分子生物学研究领域的热点之一。近年来, 用于识别差异表达基因的方法已发展起来多种。DDRT-PCR 是近年来较为广泛应用的一种技术。理论上, DDRT-PCR 技术比较简单, 但实施起来却存在着假阳性率高, 凝胶中单条 cDNA 带成分不均一, 所获 cDNA 仅代表着 mRNA 3'UT 区 (约 300 bp) 以及一些低拷贝数 mRNA 不能有效被呈现等问题。对 DDRT-PCR 技术的改良也主要集中在解决这些问题方面。

关键词 mRNA, 差异显示, 聚合酶链反应

学科分类号 Q751

基因的选择表达, 决定着整个生命过程中的发育, 分化, 内环境稳定, 刺激反应, 细胞周期调控, 衰老以及程序化死亡等。正常的发育过程和引起疾病的病理变化均由基因表达的改变所引起。通过比较不同细胞类型的基因表达情况可以分析控制人类生命活动的生物学过程。目前对 mRNA 进行比较研究的方法已发展起来多种。本文仅对近年来应用较为广泛的差异显示反转录 PCR (differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR) 技术作一详细综述, 供从事相关工作的研究者参考。

1 DDRT-PCR 技术基本原理

DDRT-PCR 技术以分子生物学上最广泛应用的两种技术 PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳为基础。其基本原理是, 以一对细胞 (或组织) 的总 RNA 反转录而成的 cDNA 为模板, 利用 PCR 的高效扩增, 通过 5'端与 3'端引物的合理设计和组合, 将细胞 (或组织) 中表达的约 15 000 种基因片段直接显示在 DNA 测序胶上, 从而找出一对细胞 (或组织) 中表达有差异的 cDNA 片段。同其他方

Tel: (029) 3374771; E-mail: zhaojr@yeah.net

收稿日期: 1998-11-18, 修回日期: 1999-04-26

法相比较, DDRT-PCR 技术具有快速, 多功能, 所需 RNA 量少和重复性高等优点^[1].

理论上, DDRT-PCR 技术比较简单, 但实施起来却存在着一些问题, 如大多数差异显示的 DNA 带多为假阳性 (大于 70%), 凝胶中单条带可能由 1 种以上 cDNA 片段所构成, 所获 cDNA 仅代表着 mRNA 3' UT 区 (约 300 bp) 以及一些低拷贝数 mRNA 不能有效被呈现等. 对 DDRT-PCR 技术的改良也主要集中在解决这些问题方面.

2 引物设计及 PCR 循环参数优化

DDRT-PCR 引物设计应遵循以下几个原则: 第一, 要能覆盖所有的 mRNA 序列; 第二, 每一对引物组合可扩增出 50~100 种 cDNA (这一数字同凝胶显示的 DNA 条带数相接近); 第三, 在退火温度条件下, 引物内部不形成发夹状结构, 引物间不形成二聚体; 第四, 便于对 PCR 产物进行分子克隆操作.

Liang 等 (1992 年) 所设计的第一代引物, 3' 端引物为 5' T₁₂ (A/C/G) (A/T/C/G), 是根据大多数真核细胞 mRNA 都具有 poly (A) 尾而设计的. 理论上每一种 3' 引物可覆盖 mRNA 总类的 1/12; 5' 端引物为 20 种 10mer 引物, 同 3' 端引物共有 240 种组合. 循环参数为 94 °C 30 s, 42 °C 1 min, 72 °C 30 s 40 个循环. Bauer 等 (1993 年) 所设计的 5' 端 10 mer 随机引物则为 26 个. 为简化对总 mRNA 的筛选, 降低 PCR 总次数, Liang 等^[2]用 4 个 3' 端简并引物, T₁₂MA, T₁₂MC, T₁₂MG, T₁₂MT (M 为 A/C/G) 进行反转录和 PCR 反应. 这四组 3' 端引物将总 mRNA 分为 4 类, 引物组合为 80 种. Sompayrac 等 (1995 年) 则将 12 个 3' 端引物分为三组, 组内的 4 个引物要比上述引物组中的引物具有更为相近的退火温度, 假阳性率显著降低. Liang 等^[3]所设计的第二代引物, 改两个碱基固定的 oligo (dT) 引物为一个碱基固定的引物, 既 T₁₂A, T₁₂G 和 T₁₂C, 且在引物的 5' 端各引入了一个 *Hind* III 酶切位点. 5' 端同 3' 端引物共有 60 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有效, DNA 带型也更加清晰. Liang 等所设计的第三代引物进一步降低了工作量, 5' 端引物由 20 种降至 8 种, 3' 端引物仍为 3 种, T₁₁G, T₁₁A 和 T₁₁C, 5' 端同 3' 端引物共有 24 种组合, 循环参数为 94 °C 30 s, 40 °C 2 min, 72 °C 30 s 共 40 个循

环 (Genhunter Corporation RNImage™ Kit1).

在 Liang 等对 DDRT-PCR 技术进行改进的同时, 一些研究者试图通过延长引物和优化 PCR 循环参数来提高 DDRT-PCR 技术的重复性, 降低假阳性率^[4]. 而另一些研究者则通过提高 5' 端随机引物的 A/T 含量及其长度来克服差异显示带多为 10mer/10mer 产物等现象. 经如此改进后的 DDRT-PCR 技术能有效克服上述现象, 但也可能会漏掉 G/C 含量丰富的差异表达基因^[5].

另外也有报道指出, 用含次黄苷的引物进行 DDRT-PCR 可提高 DNA 带型的重复性及 mRNA 检测数目 (Rohrwild, 1995 年). 需要指出的是, 用随机引物法识别基因有时并不是最佳方法. 比如在识别某一类型的基因时, 我们可以通过比较某一类已知基因的保守序列而设计出简并寡核苷酸引物或通用引物进行 DDRT-PCR 实验 (Hsu, 1993 年).

3 PCR 产物鉴定方法

DDRT-PCR 技术除存在假阳性率高问题外, 另外一个突出的问题就是凝胶中单条 cDNA 带可能由 1 种以上 cDNA 片段所构成 (Li, 1994 年). 尽管也有报道指出, 大体上, 一条 DNA 带仅代表一种基因 (Guimaraes, 1995 年), 也有不少关于通过多种途径对 PCR 产物进行直接测序的报道, 但直接测序成功是以 DNA 带成分单一为前提的. 而且越来越多的报道指出, 凝胶中 DNA 带多由不同的 cDNA 片段所构成的 (Linskens, 1995 年). 差异显示 DNA 条带的一些 cDNA 片段可能来自于差异表达的基因, 另一些则可能来源于组成性表达的基因. 为避免不必要的克隆鉴定过程, 建立一种有效的 PCR 产物筛选方法显得尤为重要.

标准的筛选方法以重扩增产物为探针, RNA 印迹反应阳性者被克隆入载体, 然后用亚克隆片段作探针进行第二次 RNA 印迹分析确定阳性克隆. 由于重扩增的 cDNA 由多种成分所组成, 因此用重扩增产物作探针可能会检测到多种 mRNA. 再者, 由于 cDNA 的复杂度事先并不知道, 因此要挑选多少个克隆才能获得阳性克隆仍是个未知数, 而且类似的这些方法需大量的 RNA. 虽然 Mathieu-Daude 等 (1996 年) 报道可用 SSCP (单链构象多态性) 凝胶电泳来估计 cDNA 带的复杂度, 但随着条带及条带复杂度的增大, 确定单个 cDNA 的数目及其丰度会越来越困难.

Callard 等 (1994 年) 建议将来源于同一 DNA

带的几个克隆的质粒点于尼龙膜上, 然后同从凝胶中洗脱出来的部分 DNA 杂交. 若差异 DNA 带由多个组成性表达的基因所构成或一种组成性表达的基因在差异带中所占比例较大, 则该方法并不适用. Mou 等 (1994 年) 用狭缝杂交法对所获 cDNA 进行批量筛选. 同重扩增产物杂交的探针为经放射性标记的 dsDNA. 同单个 RNA 印迹分析法相比, 该方法快速且所需 RNA 量少. Vogel-Lange 等^[6]则建议将实验组和对照组的 DDRT-PCR 反应混合物分别同来源于同一条 DNA 带的几个克隆杂交, 通过比较杂交带型, 就可将来源于组成性表达基因的克隆同来源于差异表达基因的克隆区分开来. Zhang 等 (1996 年) 所报道的差异筛选 (differential screening) 方法用反向 RNA 印迹 (reverse northern blot) 和克隆杂交来筛选真正代表差异表达 mRNA 的 cDNA 片段. 该方法具有简便、快速和高效等优点, 且一旦确定某一克隆为阳性克隆, 即可被直接测序并同基因库序列进行比较, 必要时还可用作探针直接筛选 DNA 文库. 在 mRNA 较为充足的情况下 (约需 10~50 μg 总 RNA) 该方法不失为一种较好的筛选方法. 但其最大缺点是不能检测低丰度 mRNA. Poirier 等^[7]所报道的阳性克隆筛选方法, 所用 cDNA 探针来源于扩增的 RNA. 该方法仅用微克的总 RNA 即可对阳性克隆进行大规模筛选, 筛选敏感度至少可达 1/40 000. Chwetzoff 等 (1997 年) 报道, 在实验材料不足的情况下, 用总 mRNA RT-PCR 产物代替总 mRNA 进行 RNA 印迹分析, 实验结果同常规 RNA 印迹分析相当. 而 Ross 等 (1997 年) 则报道用扩增的总 cDNA 作探针同 cDNA 片段杂交是一种较敏感的筛选方法. 另外也可用核酸酶保护实验 (ribonuclease protection assays, RPA) 来分析 DDRT-PCR 中差异显示的 cDNA 片段, 放射性标记的 RNA 探针来源于克隆 cDNA 的体外转录 (Liu, 1997 年).

需要指出的是, 用 PCR 产物或克隆的 PCR 产物制备的探针进行 RNA 印迹分析可能会失败, 其中的一个可能原因是探针过短. RNA 印迹分析可能会失败的另外一个可能的原因是 mRNA 丰度过低. 要检测到这些 mRNA 需 10 μg poly (A)⁺ mRNA 或进行反向杂交或进行 RT-PCR 分析.

以上分析方法均用放射性同位素作为标记分子, 操作中需防护措施. Smith 等^[8]在荧光 DDRT-PCR (FDDRT-PCR) 基础上所建立的克隆筛选方法, 通过在自动测序仪上比较重扩增产物及克隆

cDNA 片段重扩增产物的酶切指纹, 对来源于重扩增产物的大量克隆进行快速鉴定识别.

4 实验材料选择

在细胞或组织选择方面, 如有可能, 相互比较的样本在基因型上应一致或比较接近, 以减少非相关带的检测. 对于肿瘤组织而言, 从同一个体同时获得肿瘤组织和非瘤组织较为可取 (Sager, 1993 年). 对于培养的细胞而言, 互相比较的细胞应在相同的培养基中培养. 在 RNA 提取前, 相互比较的细胞应具有相近的生长密度. 另外, 用两种细胞系同时进行 DDRT-PCR 反应或者将实验组细胞用诱导剂处理一段时间后再进行 DDRT-PCR, 也可降低假阳性率.

高质量的 RNA 是 DDRT-PCR 技术成功的关键因素之一. 高质量的 RNA 应满足以下两个条件: 无 DNA 污染和 RNA 分子比较完整. Hadman 等^[9]的实验表明, 以 mRNA 代替总 RNA 进行 DDRT-PCR 实验, 电泳条带比较清晰. 因此建议用纤维素-oligo (dT) 柱对总 RNA 进行纯化, 若无纤维素-oligo (dT) 柱, 可用细胞质 RNA 代替 mRNA, 这可排除因核 RNA 存在而引起的假阳性. 另外, 有报道指出, 用结合有生物素-oligo (dT) MN 的链亲和素包被磁珠可直接从细胞裂解液中纯化 mRNA, 既简化了纯化步骤, 又减少了 DNA 及 rRNA 序列的污染^[10].

有报道指出, 用两个反转录酶制备的 cDNA 进行 DDRT-PCR 可降低假阳性 (Sung, 1997 年), 而用两种耐热 DNA 聚合酶混合物或仅用一种 rTthDNA 聚合酶进行 DDRT-PCR 反应, 既可提高 PCR 产物的长度 (150 bp~2.0 kb) 和产量, 也可提高 PCR 的忠实性^[11]. 抗 Taq DNA 聚合酶也可应用于 DDRT-PCR 反应以降低假阳性率. 需要指出的是, 不同来源的 Taq DNA 聚合酶的贮存缓冲液及其在贮存和反应温度下的活力可能会存在差异, 从而可能会导致 DNA 带型的差异 (约 5%). 因此, 在进行 DDRT-PCR 实验时, 所有的 PCR 反应最好都应用同一样本的 Taq DNA 聚合酶 (Haag, 1994 年).

Chen 等 (1994 年) 的实验证实, 一些 PCR 反应管可能抑制 PCR 反应, 而与 PCR 反应管的形状及其在 PCR 仪中的位置无关, 其原因尚不清楚. 为避免一些珍贵标本的损失, Chen 等建议在应用一种新型反应管之前, 应事先测试几个反应管.

在标记分子的选择方面,有放射性标记分子和非放射性标记分子两大类. Liang 等 (1992 年) 最初报道的 DDRT-PCR 方法中用³⁵S 作为标记分子,在 PCR 反应过程中将其掺入到产物中. 同³³P 和³²P 相比较,³⁵S 分辨力高,操作不需防护,但其高温下易分解挥发,曝光所需时间长 (Liang, 1995 年; Clinton, 1995 年). 为避免放射性污染并提高 DDRT-PCR 敏感性,缩短曝光时间, Trentmann 等 (1995 年) 建议用³²P 代替³⁵S. 但用³²P 取代³⁵S 也存在两大问题,一是实验中需物理防护;二是条带分辨力低.³³P 的半衰期介于³⁵S 和³²P 之间,兼有二者之优点,是一种较好的同位素标记方法.

虽然用放射性同位素标记 PCR 产物的 DDRT-PCR 方法比较灵敏,但也易导致 DNA 条带的误切,以致影响后面的实验. 另外,同位素对人体有损害. 理想的标记分子应同时兼顾灵敏和安全等特点. 为避免不必要的失败和同位素对人体的损害,一些研究者采用荧光素代替同位素对 PCR 产物进行标记,电泳分离后的产物可在 DNA 测序仪上读取,既改善了操作的安全性,也提高了敏感性 (可达 $2 \times 10^{-5}\%$) 和差异显示的分辨率. 关于这方面的报道很多,甚至出现了通用荧光标记引物^[12]. Lohmann 等 (1995 年) 则采用聚丙烯酰胺凝胶水平电泳银染法显示电泳结果,发现其分辨率及敏感性同放射自显影几乎一致. An 等所报道的敏感的非放射性 DDRT-PCR 法则基于化学发光对 PCR 产物进行检测. Chen 等 (1996 年) 用地高辛对 PCR 产物进行标记,电泳后 PCR 产物被电转移至尼龙膜上,并用显色试剂显色. 从尼龙膜上切下的差异条带无需任何纯化即可进行再扩增并作进一步鉴定,而且含有 DNA 的尼龙膜可于室温保存数月,其上的 DNA 含量可用作 PCR 模板至少 5 次.

在电泳系统方面,除上述已提到的电泳系统外,George 等^[13]报道用毛细管电泳系统 (ABI 310) 对荧光标记的表达序列标签进行快速自动化识别可提供同 ABI377 电泳系统相同的准确性和重复性,而且该电泳系统经改造后可用于 cDNA 带的收集. 电泳中所用的凝胶多为变性聚丙烯酰胺凝胶. 但也有关于用非变性聚丙烯酰胺凝胶 (Kociok, 1998 年) 和琼脂糖凝胶进行电泳 (Wolfgang, 1997 年) 的报道.

5 快速 DDRT-PCR 法探讨

标准的 40 个循环的 PCR 反应所需时间约 5 h,

而用气体温度循环仪则可缩短 PCR 反应时间,整个扩增时间可降至 15 min 或更短 (Wittwer, 1991 年). 快速 PCR 的理论依据是,在 68℃~80℃ 范围内, Taq DNA 聚合酶的延伸速率为 100 nt/s,按温度改变率 1℃/s 计算,从 68℃ 向 80℃ 升温的过程中可扩增 1.2 kb 的 DNA. Liu 等^[14]的实验表明,在传统热循环仪上也可进行快速常规 PCR 反应和快速 DDRT-PCR 反应. 需要指出的是,进行快速 DDRT-PCR 的前提条件是必须提高 dNTP 浓度 (从 2.5 μmol/L 提高至 25 μmol/L 或 250 μmol/L).

6 全基因序列获得

DDRT-PCR 的靶点位于 mRNA 3' 非翻译区 (3' UTR),许多先前识别过的基因的 3' UTR 区在基因序列库中可能并不存在. 因此,必须通过某种途径获得翻译区序列才能对基因作进一步鉴定. 一些实验者通过筛选 cDNA 文库来获得翻译区序列. cDNA 文库筛选比较费时且存在一些问题,因为不同基因的 3' 非翻译区可能会十分相似. 5' RACE (5' rapid amplification of cDNA ends) 相关技术是研究者较为常用的获全长 cDNA 序列的方法^[15]. 而 Zeiner 等 (1994 年) 却指出,由于同聚加尾和单链连接的反应效率相当低,存在较高的非特异扩增以及需 2 轮 PCR 反应等原因, RACE 技术通常并不能产生预期的效果. 近年来反向 PCR 技术已成功地运用于 5' 端 cDNA 序列克隆. Zeiner 等将反向 PCR 技术作了改进,改进后的反向 PCR 技术以基因特异性序列作为引物进行反转录反应. Sompayrac 等^[16]所设计的步移 (walk in steps) 克隆策略,也是在反向 PCR 技术的基础上建立的. 用该步移策略每次可获得约 1 kb 长的 5' 端 cDNA 序列.

7 DDRT-PCR 技术敏感性探讨

真核细胞 mRNA 中,低丰度 mRNA 种类 (占总 mRNA 的 0.004%) 约占 90%,因此, DDRT-PCR 技术对低丰度 mRNA 是否敏感显得尤为重要. 尽管有报道指出, DDRT-PCR 技术对低丰度基因克隆有较强的优势,但一项专门探讨 DDRT-PCR 技术敏感性问题的研究结果却表明, DDRT-PCR 技术对高丰度 mRNA 具有明显的倾向性,不管用多少个 10mer 引物,标准的 DDRT-PCR 技术并不能有效显示细胞中的大量 mRNA^[17]. 通过实

验 Bertioli 等 (1995 年) 得出结论, 竞争可能是导致 DDRT-PCR 技术敏感性较低的决定因素, 通过提高引物特异性或用相对简单的模板进行 DDRT-PCR 反应, 提高 PCR 效率以及加入更多的限制底物可能会降低 DDRT-PCR 对高丰度 mRNA 的倾向性. Wang 等^[18]通过在 PCR 前将转录的 cDNA 同 20 倍过量的对照组 RNA 杂交, 来减少 PCR 中的竞争. Senju 等 (1997 年) 则通过将以 PCR 为基础的消减杂交同差异显示组合来识别 INF- γ 诱导表达的基因. Li 等^[19]除应用长引物来提高 PCR 效率外, 还通过在 oligo (dT) 引物的 3' 端加上 3 个碱基, 将总 mRNA 分为 48 个复杂度更小的组, 减少 PCR 中的竞争.

综上所述, 引物和 PCR 循环条件逐渐接近标准的 PCR 反应, PCR 产物鉴定更为简便, 快速和准确, 用非放射性 DDRT-PCR 尤其是自动化荧光 DDRT-PCR 取代放射性 DDRT-PCR, 提高 DDRT-PCR 对低拷贝数 mRNA 敏感性及使 DDRT-PCR 反应过程更为快速等将是 DDRT-PCR 技术的发展趋势. 尤其是 DDRT-PCR 对低丰度 mRNA 的敏感性问题, 对 DDRT-PCR 技术本身尤其重要, 因为低丰度的 mRNA 占了总 mRNA 的 90%.

参 考 文 献

- Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (5072): 967~ 971
- Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acids Res*, 1993, **21** (14): 3269~ 3275
- Liang P, Zhu W, Zhang X, *et al.* Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5763~ 5764
- Diachenko L B, Ledesma J, Chenchik A A, *et al.* Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **219** (3): 824~ 828
- Graf D, Fisher A G, Merkenschlager M. Rational primer design greatly improves differential display PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (11): 2239~ 2240
- Vogelstein R, Burckert N, Bollert T, *et al.* Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display. *Nucleic Acids Res*, 1996, **24** (7): 1385~ 1386
- Poirier G M, Pyati J, Wan J S, *et al.* Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (4): 913~ 914
- Smith N R, Li A, Aldersley M, *et al.* Rapid determination of the complexity of cDNA bands extracted from DDRT-PCR polyacrylamide gels. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (17): 3552~ 3554
- Hadman M, Adam B L, Wright G L, *et al.* Modifications to the differential display technique reduce background and increase sensitivity. *Anal Biochem*, 1995, **226** (2): 383~ 386
- Rosok O, Odeberg J, Rode M, *et al.* Solid-phase method for differential display of genes expressed in hematopoietic stem cells. *Biotechniques*, 1996, **21** (1): 114~ 121
- 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
- Smith N R, Aldersley M, Li A, *et al.* Automated differential display using a fluorescently labeled universal primer. *Biotechniques*, 1997, **23** (2): 274~ 279
- George K S, Zhao X, Gallahan D, *et al.* Capillary electrophoresis methodology for identification of cancer related gene expression patterns of fluorescent differential display polymerase chain reaction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, **695** (1): 93~ 102
- Liu L Z, Shearn A. Rapid PCR for RNA differential display in a conventional heat block thermal cycler. *Biotechniques*, 1995, **19** (1): 44~ 46
- Wang X, Brownstein M J, Young W S. PG25, a pineal-specific cDNA, cloned by differential Display PCR (DDPCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). *J Neurosci Methods*, 1997, **73** (2): 187~ 191
- Sompayrac L, Jane S, Burn T C, *et al.* Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (22): 4738~ 4739
- Bertioli D J, Schlichter U H, Adams M J, *et al.* An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNAs. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23** (21): 4520~ 4523
- Wang X B, Uhl G R. Subtracted differential display: Genes with amphetamine-altered expression patterns include calcineurin. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, **53** (1~ 2): 344~ 347
- Li Y, Chan P H. Identification of the pro-oncogene stathmin/op18 mRNA in the brain of mitochondrial Mn-superoxide dismutase-deficient mice by a modified differential display PCR. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, **155** (2): 277~ 284

Advance of DDRT-PCR. ZHAO Jin-Rong, YAN Xiao-Jun, SU Cheng-Zhi (*Institute of Genetic Diagnosis, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China*).

Abstract To identify and analyze differentially expressed genes between one pair of cells or tissues in different conditions is of great importance in molecular biology study. In recent years, a variety of approaches have been used to identify differentially expressed genes. DDRT-PCR is one of the most widely used approaches. In theory, DDRT-PCR technique is simple. But in practice, some limitations such as high false-positive rate, inhomogeneity of cDNA bands, short cDNA fragments and underrepresentation of low abundance mRNAs exist. Most modifications to DDRT-PCR technique mainly focus on above aspects.

Key words mRNA, differential display, polymerase chain reaction