

# 用差异显示反转录 PCR 银染技术研究 植物基因表达的差异\*

毛爱军 王台\*\* 宋艳茹

(中国科学院植物研究所, 北京 100093)

**摘要** 通过调整差异显示反转录 PCR (DDRT-PCR) 中总 RNA、锚定引物、随机引物、cDNA 和 dNTP 等关键试剂的用量, 优化了适用于银染检测的 DDRT-PCR 方法. PCR 扩增产物经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离后, 银染能检测到多而清晰的条带. 泳道中的条带数最少为 40 个, 最长达 80 个, 平均为 60 个, 条带大小分布在 100~900 bp 范围, 灵敏度为 5 pg/mm<sup>2</sup>. 此方法操作简便快速, 灵敏度高, 重复性好. 采用这个改良的方法, 分析了拟南芥野生型和 *ast* 突变型基因表达的差异. 从 16 000 个 cDNA 扩增产物条带中筛选出 28 个差异条带. 二次 PCR 扩增后, 进一步筛选出 13 个差异条带, 其中 7 个是野生型特异表达的, 6 个是突变型特异表达的, 为进一步认识 *ast* 突变型的产生机制奠定了基础.

**关键词** 差异显示反转录 PCR, 银染, 拟南芥, *ast* 突变型

**学科分类号** Q943

研究一对细胞或组织在不同发育时期或不同发育状态下基因表达的差异, 进一步克隆差异表达的基因, 已成为当今发育生物学研究的热点之一. 差异显示反转录 PCR 技术 (differential display reverse transcription polymerase chain reaction, DDRT-PCR) 是近年来在研究基因差异表达方面应用较为广泛的一种技术, 由 Liang 等<sup>[1]</sup>于 1992 年首次建立, 该技术可分为三个基本步骤. 第一步进行反转录: 分别提取两种材料中的总 RNA 或 mRNA, 反转录成 cDNA. 第二步进行 PCR 扩增: 利用 cDNA 3' 端锚定引物和 5' 端随机引物组成引物对, 在较低退火温度下 (如 40~42 °C) 对 cDNA 进行扩增. 第三步分离扩增产物: 利用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对 PCR 产物进行分离, 在相邻泳道上比较基因表达的差异. DDRT-PCR 技术灵敏度高, 操作简便, 但其明显的缺点是假阳性高. 该技术发展至今已有不少改进, 如在实验材料的选择<sup>[2]</sup>、引物设计<sup>[3, 4]</sup>、PCR 循环参数的优化<sup>[5]</sup>、扩增产物的鉴定<sup>[6, 7]</sup>等方面, 针对不同的实验材料和研究目的, 研究者提出了相应的实验方案, 但这些方案在产物检测时都不可避免地使用了放射自显影技术. 由于使用同位素存在成本高、半衰期问题以及对操作者有健康危害, Lohmann 等<sup>[8]</sup>用银染法检测出了 DDRT-PCR 产物差异条带, 但采用的是水平电泳仪和不连续的缓冲液系统进行电泳, 泳道中的条带多分布于上、中部, 底部的条带有压缩现象. 该电泳系统在国内的实验室不常用, 方法难以

推广. Robert 等<sup>[9]</sup>也用银染法研究光周期诱导和非诱导的 *Perilla crista* 基因表达的差异, 采用的是 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, PCR 所用的 dNTP 浓度为 200 μmol/L, 但较高的 dNTP 浓度容易导致非特异性扩增<sup>[1]</sup>. 本工作在前人 DDRT-PCR 方法的基础上对几种关键试剂的用量进行了调整, 摸索出了一套适用于银染检测 DDRT-PCR 产物的各试剂用量. 用此改良的方法分析了拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 野生型及 *ast* 突变型基因表达的差异, 在两种材料中分别筛选出了一些特异表达的 cDNA 片段.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥 *Columbia* 野生型和 *ast* 突变型 (*anthocyanin spotted testa, ast*) 种子播种在含有营养土的花盆中, 于 25 °C 恒温、16 h/8 h 光周期条件下培养. 收集开花后第三天的角果, 于液氮中保存备用.

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 的制备:** 用 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒 (QIAGEN), 提取开花后第 3 天野生型和 *ast* 突变型角果中的总 RNA. 向 RNA 水溶液中加入

\* 中国科学院生物科学与生物技术特别支持费资助课题 (STZ98-2-14).

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-62591431-6210, E-mail: twang@public2.east.net.cn

收稿日期: 2000-10-10, 接受日期: 2000-12-12

入 10  $\mu$ l 10 $\times$  DNase I 缓冲液, 0.5  $\mu$ l RNasin (40~200 U/ $\mu$ l), 2  $\mu$ l DNase I (5 U/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l 0.1 mol/L DTT, 用 DEPC 处理的水调至 100  $\mu$ l. 37 $^{\circ}$ C 保温 15 min 以除去 DNA. 等体积的酚: 氯仿抽提后, 12 000 r/min 离心 10 min. 取上清, 加入 1/10 体积的 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的预冷乙醇, -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min 以上, 10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 下离心 15 min. RNA 沉淀用 75% 乙醇淋洗两次, 在超净台上吹干, 溶于 DEPC 处理的水中. RNA 溶液用 Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) 定量后, 用于反转录.

**1.2.2 反转录:** 取 4  $\mu$ g 总 RNA, 加入 2  $\mu$ l 10  $\mu$ mol/L 锚定引物 (AAGCT<sub>10</sub>C 或 AAGCT<sub>10</sub>G), 用 DEPC 处理的水调至 11  $\mu$ l, 70 $^{\circ}$ C 保温 10 min, 迅速置于冰水中冷却. 加入 4  $\mu$ l 5 $\times$  第一链反应缓冲液, 2  $\mu$ l 0.1 mol/L DTT, 2  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP, 42 $^{\circ}$ C 温育 2 min 后, 加入 1  $\mu$ l SuperScript TMII RNase H<sup>-</sup> 逆转录酶 (200 U/ $\mu$ l, GIBO-BRL), 42 $^{\circ}$ C 保温 50 min, 70 $^{\circ}$ C 处理 15 min 终止反应.

**1.2.3 PCR:** 分别用两种与逆转录相同的 3' 端锚定引物和 80 种 5' 端 10 mer 随机引物 (Operon Biotechnology, A1-20, B1-20, C1-20, D1-20) 组成 160 对引物, 同时对野生型及突变型植株来源的 cDNA 进行扩增. 20  $\mu$ l PCR 反应体系中, 含有 1 $\times$  PCR 缓冲液, 100  $\mu$ mol/L dNTP, 0.2  $\mu$ mol/L 随机引物, 1  $\mu$ mol/L 锚定引物, 2  $\mu$ l cDNA 反应混合物, 2.5 U Taq DNA 聚合酶 (上海生工公司). 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min 后, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 42 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环. 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. PCR 产物于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用.

**1.2.4 电泳及银染:** 取 7  $\mu$ l PCR 产物, 加入 4  $\mu$ l 变性上样缓冲液 (95% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA pH 8.0, 0.02% 二甲苯青 FF), 沸水浴中加热 2 min, 迅速置于冰上冷却 5 min 备用. 用含 7 mol/L 尿素的 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分析, 凝胶面积 20 cm $\times$ 20 cm, 厚度 0.4 mm, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$  Tris 硼酸缓冲液. 恒功率 6 W 预电泳 30 min 后加样, 以恒功率 6 W 继续电泳, 至二甲苯青 FF 距凝胶底部边缘 1 cm 时结束. 小心剥下凝胶, 用 DNA Silver Staining System 试剂盒 (Promega) 进行银染, 银染后的凝胶用玻璃纸制成干胶保存. 银染结果用扫描仪进行扫描.

**1.2.5 重复性检测:** 取同一种 RNA 样品两份各 4  $\mu$ g, 在相同条件下平行进行反转录、PCR、电泳

和银染.

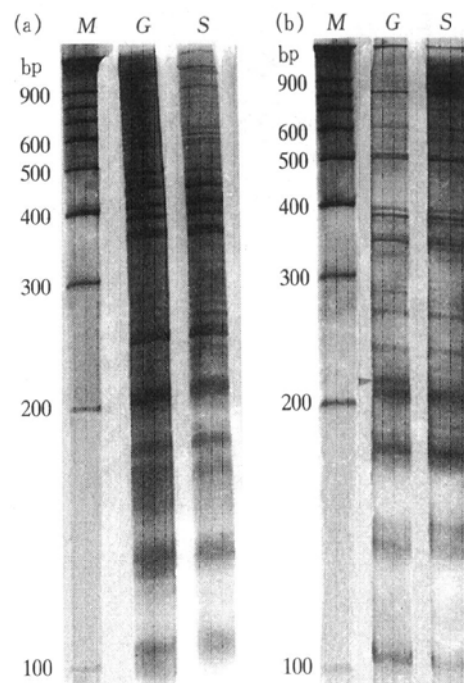
**1.2.6 灵敏度检测:** 用 300 bp 长的 cDNA 片段, 经 Gene Quant RNA/DNA Calculator 定量后, 用灭菌双蒸水依次稀释成含 500  $\mu$ g、250  $\mu$ g、100  $\mu$ g、50  $\mu$ g、25  $\mu$ g 的 cDNA 溶液各 10  $\mu$ l, 进行电泳及银染.

**1.2.7 差异条带的二次 PCR 检测:** 切下凝胶中 cDNA 差异条带及相邻泳道中相应的空白区域, 用灭菌双蒸水充分冲洗后, 分别加入 30  $\mu$ l 灭菌双蒸水, 沸水浴中加热 10 min, 提取凝胶中的 cDNA. 用该 cDNA 水溶液作模板进行第二次 PCR 扩增, PCR 的引物组合和条件与相应的 DDRT-PCR 相同. 产物用银染检测.

## 2 结 果

### 2.1 PCR 扩增产物的分离

RNA 经反转录和 PCR 扩增后, PCR 产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳分离. 银染结果表明, 随着引物组合的不同, 泳道中显示出的条带数也不相同, 最少有 40 个条带, 最多可达 80 个条带, 平均为 60 个条带. 条带的大小分布范围较广, 从 100 bp 至 900 bp (图 1). 用 DDRT-PCR 结合银



**Fig 1 Differential display of total RNAs from siliques of *Columbia* wild type (G) and *ast* mutant (S)**

(a) PCR amplification was conducted with the primer AAGCT<sub>10</sub>C and OP-C17; (b) PCR amplification was conducted with the primer AAGCT<sub>10</sub>C and OP-A7. The differentially expressed cDNA fragment is indicated by black arrow. The numbers on left show the size of cDNA fragments (bp). M: 100 bp ladder.

染检测, 显示出多而清晰的条带是筛选基因差异表达的前提.

### 2.2 重复性及灵敏度

取两份相同的 RNA 样品, 平行进行 DDRT-PCR 及银染, 两个相邻泳道中相应条带均相同 (图 2). 说明本方法具有很好的重复性. 用长为 300 bp 的 cDNA 作标准, 本实验系统能检测到 25 pg cDNA 条带, 条带面积为 5 mm<sup>2</sup>, 灵敏度达 5 pg/mm<sup>2</sup> (图 3).

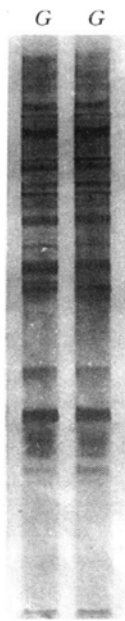


Fig. 2 Reproducibility of DDRT-PCR. It was analyzed using total RNA from *Columbia* wild type (G) with the primer pair AAGCT<sub>10</sub> G and OP-D1.

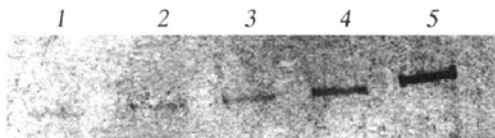


Fig. 3 Sensitivity of silver staining

1: 25 pg; 2: 50 pg; 3: 100 pg; 4: 250 pg; 5: 500 pg.

### 2.3 差异 cDNA 片段的筛选

利用本文中 DDRT-PCR 和银染方法, 对拟南芥 *Columbia* 野生型及 *ast* 突变型基因表达的差异进行了分析. 拟南芥 *ast* 突变体 (*anthocyanin spotted testa*, *ast*) 是一种新型的花青苷代谢突变体, 由碳离子辐射诱变产生, 受单隐性核基因控制, 该基因已被定位在第一染色体上. 其表型是在未成熟种子的种皮中积累花青苷, 种皮出现紫红色斑点, 而野生型的种皮没有色素斑点, 幼嫩种子为

淡绿色. 在突变体中, 花青苷在开花后两天的未成熟种子的种皮中开始积累, 至第六天达到高峰, 表明 *ast* 基因表达具有明显的时空特性<sup>[10]</sup>. 为了克隆 *ast* 突变基因, 进一步研究该基因在花青苷代谢中的功能、基因时空性顺序表达的调控机制以及碳离子辐射诱导基因突变的分子机制, 我们从基因表达的角度开始, 以开花后第三天的角果为材料, 筛选特异表达的 cDNA 片段. 共用了 160 对引物组合, 对 320 个 cDNA 样品进行分析. 多数引物对不能检测到野生型和突变型角果中基因表达的差异, 仅少数引物对可扩增到差异 cDNA 片段 (图 1a 和 b), 表明二者基因表达的差异较小. 在检测到的约 16 000 个扩增条带中, 筛选出 28 个差异条带. 经二次 PCR 验证, 最终筛选出 13 个差异表达的 cDNA 片段, 其中 7 个是野生型特有的, 6 个是突变型特有的.

### 3 讨 论

本实验将 DDRT-PCR 中的总 RNA、锚定引物、随机引物、cDNA 和 dNTP 等关键试剂的用量调整后, 用银染方法能检测到多而清晰的 cDNA 条带, 且重复性好, 灵敏度较高. 本方法可应用于拟南芥等植物材料基因表达差异的研究. 本实验采用常用的垂直电泳槽和 0.5 × Tris 硼酸缓冲液系统对 PCR 扩增产物进行分离, 仪器简单实用, 方法易于被一般实验室所接受.

与同位素标记的方法相比, 银染法具有以下优点: 实验成本低, 无放射性危害, 操作简便快速, 从 RNA 的提取到差异条带的检出, 整个过程可在 2 d 内完成, 差异条带可直接从胶上切取, 避免了把 X 光片与胶对应后切胶而造成的误切. 沸水浴加热后, 从细小的胶条中溶出的 cDNA 可直接用于二次 PCR 扩增. 经过不断地摸索, 我们认为应用 DDRT-PCR 和银染方法分析基因表达的差异应特别注意以下几个问题:

a. 用完整纯净的 RNA 进行反转录. 琼脂糖电泳后 EB 染色, 28S RNA 的亮度应为 18S RNA 亮度的两倍. 纯净的 RNA 样品,  $A_{260}/A_{280}$  的比值为 1.8~ 2.0,  $A_{260}/A_{230}$  的比值应大于 2.0. 必须除去 RNA 样品中的 DNA, 否则 PCR 扩增后条带的重复性差, 假阳性多.

b. 应用银染检测, 反转录及 PCR 反应混合物中各种试剂用量与放射自显影的不同. 如 PCR 扩增时 dNTP 的终浓度, 放射自显影检测用

2  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[1, 3]</sup>, 对于银染检测, Robert<sup>[9]</sup>用了 200  $\mu\text{mol/L}$ , 该作者提出用 20  $\mu\text{mol/L}$  dNTP 不能用银染法检测出 PCR 扩增产物. 但是较高的 dNTP 浓度易导致非特异性扩增<sup>[1]</sup>. 本实验将 dNTP 的终浓度调整到 100  $\mu\text{mol/L}$ , 银染结果表明, 泳道中显示的条带多而清晰, 而且重复性好.

c. 为了维持扩增产物的单链状态, 含 7 mol/L 尿素的测序胶在电泳时恒功率比恒电流或恒电压效果好, 不同的胶板面积, 应使用不同的恒功率.

d. 银染所用器皿和水应洁净、无杂离子污染, 否则会降低银染灵敏度, 增加背景. 本实验所用的水为 Mill-Q 超纯水 (18.2M  $\Omega \cdot \text{cm}$ ).

e. 由于银染的灵敏度所限, 与差异条带对应的相邻泳道的空白区域仍可能含有极微量的核酸 (< 5  $\text{pg/mm}^2$ ), 因此有必要进行第二次 PCR 扩增, 以验证 DDRT-PCR 差异条带的真实性, 筛选出特异表达的 cDNA 片段. 这些 cDNA 片段可通过 RNA 印迹等方法进一步加以鉴定.

### 参 考 文 献

- 1 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (14): 967~ 971
- 2 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
- 3 Liang P, Averboukh L, Pardee A B. Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: refinements and optimization. *Nucleic Acid Res*, 1993, **21** (14): 3269~ 3275
- 4 Liang P, Zhu W, Zhang X, *et al.* Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acid Res*, 1994, **22** (25): 5763~ 5764
- 5 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 Comm*, 1996, **219** (3): 824~ 828
- 6 Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acid Res*, 1996, **24** (12): 2454~ 2455
- 7 Zegzouti H, Marty C, Jones B, *et al.* Improved screening of cDNAs generated by mRNA differential display enables the selection of true positives and the isolation of weakly expressed messages. *Plant Mol Bio Rep*, 1997, **15** (3): 236~ 245
- 8 Lohmann J, Schickle H, Bosch C G. REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *BioTechniques*, 1995, **18** (2): 200~ 202
- 9 Robert P D. Differential display without radioactivity - a modified procedure. *BioTechniques*, 1996, **21** (3): 408~ 412
- 10 Tanaka A, Tano S, Chantes T. A new *Arabidopsis* mutant induced by ion beams affects flavonoid synthesis with spotted pigmentation in testa. *Genes Genet Syst*, 1997, **72** (3): 141~ 148

## Analyzing Plant Gene Expression Differences Using a Silver Staining Based DDRT-PCR Protocol\*

MAO Ai-Jun, WANG Tai\*\* , SONG Yan-Ru

(Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract** A procedure of differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR) applicable for silver staining was optimized by adjusting the amount of several critical reagents, including total RNA, anchor primer, arbitrary primer, cDNA and dNTP. The PCR amplification products were separated on 6% vertical denaturing polyacrylamide gels. Numerous and distinct bands could be detected by silver staining. The minimum number of bands in one lane was 40, the maximum was 80 and the average was 60. The range of displayed PCR products extended from about 100 base to about 900 base. The sensitivity was 5  $\text{pg/mm}^2$ . This procedure was simple, time-saving, high sensitivity and reproducible. Based on the improved procedure, the differential gene expression were studied between immature siliques of *Arabidopsis* wild-type and *ast* mutant. From nearly 16 000 cDNA fragments analyzed, 28 differential cDNA fragments were screened. After the second PCR amplification, 13 differential cDNA fragments were identified among which 7 fragments were wild type specific and 6 fragments were *ast* mutant specific.

**Key words** differential display reverse transcription polymerase chain reaction, silver staining, *Arabidopsis thaliana*, *ast* mutant

\* This work was supported by a grant from Life Science Special Fund of CAS by the Ministry of Finance (STZ98-2-14).

\*\* Corresponding author. Tel: 86-10-62591431-6210, E-mail: twang@public2.east.net.cn

Received: October 10, 2000 Accepted: December 12, 2000